
Molekulare Charakterisierung und pathogene Bedeutung von cholinbindenden Proteinen von *Streptococcus pneumoniae*

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat)

genehmigte Dissertation
von

Petra Prieß
aus Hannover

2002

1. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis
2. Referent: Prof. Dr. G.S. Chhatwal
eingereicht am: 14.02.2002
Disputation am: 24.05.2002
Druckjahr: 2002

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Hammerschmidt,S., Bethe,G., **Remane,P.H.**, Chhatwal,G.S.. 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 67:1683-1687.

Tagungsbeiträge:

Remane,P.H., Hammerschmidt,S., Bethe,G., Chhatwal,G.S.. Die Lactoferrin-Bindung von *Streptococcus pneumoniae* ist PspA vermittelt. 50. Jahrestagung der DGHM in Berlin, 1998.

Remane,P.H., Hammerschmidt,S., Bethe,G., Chhatwal,G.S.. Die Lactoferrin-Bindung von *Streptococcus pneumoniae* ist PspA vermittelt. Spätsommerschule 'Mikrobielle Pathogenität' der DGHM/VAAM in Zinnowitz, 1998.

Remane,P.H., Hammerschmidt,S., Bethe,G., Chhatwal,G.S.. Iron utilization by *Streptococcus pneumoniae*. International Summer School on Molecular and Cell Biology, Spetsai, Griechenland, 1998.

Hammerschmidt,S., **Remane,P.H.**, Bethe,G., Chhatwal,G.S.. Contribution of the pneumococcal surface protein A to virulence of *Streptococcus pneumoniae* through binding to human lactoferrin. 14th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Auckland, New Zealand, 1999.

Prieß,P.H., Hammerschmidt,S., Bethe,G., Chhatwal,G.S.. Nutzung von humanem Lactoferrin als Eisenquelle durch die Bindung an PspA von *Streptococcus pneumoniae*. 4. Minisymposium 'Mikrobielle Pathogenität', Burg Rothenfels, 1999.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Die Gattung <i>Streptococcus</i> im System der Prokaryonten.....	3
2.2	Die Art <i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
2.3	Von <i>S. pneumoniae</i> verursachte Krankheiten und deren Problematik.....	4
2.4	Oberflächenstrukturen und Pathogenitätsfaktoren von <i>S. pneumoniae</i>	10
2.5	Ziele dieser Arbeit.....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Bakterienstämme.....	20
3.2	Stammhaltung.....	20
3.3	Kulturbedingungen.....	20
3.4	Nährmedien.....	20
3.5	Plasmide und Vektoren.....	20
3.6	Bakteriophagen.....	21
3.7	Antikörper und Plasmaproteine.....	21
3.8	Enzyme.....	21
3.9	Antibiotika.....	22
3.10	Oligodesoxynukleotide (Primer)	22
3.11	Reaktionskits.....	23
3.12	Puffer und Lösungen.....	24
3.13	Methoden für das Arbeiten mit DNA.....	26
3.13.1	Agarosegelelektrophorese.....	26
3.13.2	Aufreinigung von DNA.....	26
3.13.3	Phenolisierung und Fällung von DNA.....	26
3.13.4	Phenolisierung und Etherisierung von DNA.....	27
3.13.5	Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien.....	27
3.13.6	Schnellmethode zur Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> (Birboim und Doly, 1979)....	27
3.13.7	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	28

3.13.8	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> für die Sequenzierung.....	28
3.13.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989). 28	
3.13.10	Markierung von DNA-Sonden.....	28
3.13.10.1	Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin.....	28
3.13.10.2	Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden mit ³² P-dCTP.28	
3.13.11	Southern-Blot (Southern, 1975) und DNA-Hybridisierung.....	28
3.13.11.1	Hybridisierung mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden.....	29
3.13.11.2	Entfernung einer radioaktiven DNA-Sonde von hybridisierten Nylonmembranen.....	29
3.13.12	Klonierung von DNA.....	29
3.13.12.1	Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
3.13.12.2	Ligation.....	29
3.13.13	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation (Böttger, 1988)... 30	
3.13.14	Transformation von DNA in Bakterienzellen.....	30
3.13.14.1	Transformation in <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	30
3.13.14.2	Transformation von DNA in <i>S. pneumoniae</i> (Yother, 1986).....	30
3.13.15	DNA-Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	31
3.13.15.1	Auswertung der Sequenzierdaten.....	31
3.13.16	Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	31
3.14	Proteinchemische Methoden.....	32
3.14.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Maniatis, 1987).....	32
3.14.2	Herstellung von Bakterienlysaten.....	32
3.14.3	Auftrennung von Proteinen in diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid- gelelektrophorese (Laemmli <i>et al.</i> , 1970).....	32
3.14.4	Native Auftrennung von Proteinen in diskontinuierlicher Polyacryl- amidgelelektrophorese.....	33
3.14.5	Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	33
3.14.6	Dialyse von Proteinen.....	33
3.14.7	Enzymatische Untersuchungen.....	33
3.14.7.1	Enzymatischer Verdau der Pneumokokkenproteine mit PronaseE / Proteinase K.....	33
3.14.7.2	Enzymatischer Verdau der Pneumokokkenproteine Trypsin.....	33
3.14.7.3	Enzymatischer Verdau der Pneumokokkenpolysaccharide mit Neuraminidase.....	33

3.14.8 Methoden für das Arbeiten mit iodierten Proteinen.....	34
3.14.8.1 Markierung von Proteinen mit ^{125}I Iod (Hunter und Greenwood, 1962)..	34
3.14.8.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität (TCA-Fällung).....	34
3.14.8.3 Bindungsversuche für ^{125}I -markierte Proteine.....	34
3.14.8.4 Kompetitive Inhibition der radioaktiv-markierten Proteine im Bindungsversuch.....	35
3.14.8.5 Berechnung der Bindungskonstanten - Darstellung nach Scatchard (Scatchard, 1949)	35
3.14.9 Aufreinigung von His-tag-Fusionsproteinen.....	35
3.14.10 Kolonie-Immunoblot.....	36
3.14.11 Herstellung von polyklonalen Antikörperseren.....	36
3.14.12 Western-Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979).....	36
3.14.13 Probenvorbereitung zur Proteinsequenzierung.....	37
3.15 Konstruktion einer <i>S.pneumoniae</i> Genbank im λ_{Zap} Express TM Vektor.....	37
3.16. Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen in der <i>S. pneumoniae</i> Genbank....	38
3.17 Immunologische Methoden.....	39
3.17.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	39
3.17.2 Verfahren zum Testen auf Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	39
3.17.3 SPOT-Synthese von Aminosäuren auf eine Membran (Frank, 1992 und 1995)..	39
3.18 Versuche zur Eisenaufnahme.....	40
3.18.1 Wachstumsstudien unter eisenlimitierten Kulturbedingungen.....	40
3.18.1.1 Deferrierung des Eisenchelators EDDHA (Rogers, 1973).....	40
3.18.1.2 Bestimmung der wachstumshemmenden EDDHA-Konzentration..	40
3.18.2 Wachstum mit Hämin, Hämoglobin und Lactoferrin als Eisenquelle (Tai <i>et al.</i> , 1993)	40
3.18.3 Expression von Proteinen unter Eisenlimitation, sowie Lactoferrin- Supplementation.....	41
3.18.4 Spezifische Bindung von Lactoferrin an Pneumokokken.....	41
3.18.5 Untersuchung der Proteaseaktivität von Pneumokokken und Proteinen, die an eine feste Phase gebunden sind (Ascencio, 1992).....	41
3.18.6 Untersuchung der Proteaseaktivität von Pneumokokken und aufgereinigten PspA gegenüber Lactoferrin	41

4	Ergebnisse.....	42
4.1	Molekulare Untersuchungen zur Identifizierung neuer cholinbindender Oberflächenproteine von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
4.1.1	<i>S. pneumoniae</i> DNA-Expressionsbank im Phagen λ_{ZAP}	43
4.1.1.1	Southern-Blot Analyse von chromosomaler DNA von <i>S. pneumoniae</i>	43
4.1.1.2	Untersuchung der <i>S. pneumoniae</i> DNA-Expressionsbank im Phagen λ_{ZAP}	44
4.1.1.3	Southern-Blot Analyse der <i>S. pneumoniae</i> Genbank.....	45
4.1.1.4	Western-Blot Analyse der <i>S. pneumoniae</i> DNA-Expressionsbank.....	47
4.1.1.5	Bindung von humanen Serum- und Matrixproteinen an die <i>S. pneumoniae</i> DNA-Expressionsbank.....	48
4.1.2	Computer-unterstützte Identifizierung kodierender Sequenzen neuer cholinbindender Protein.....	49
4.1.3	Klonierung des cholinbindenden Proteins P4139/Cbp.....	56
4.2	Charakterisierung der Bindung von humanem Lactoferrin an <i>Streptococcus pneumoniae</i>	57
4.2.1	Untersuchungen zur Bindung von humanem Lactoferrin an <i>S. pneumoniae</i> verschiedener Serotypen.....	57
4.2.2	Western-Blot Analyse der Lactoferrin-Bindung an <i>S. pneumoniae</i>	59
4.2.3	Bestimmung der Spezies-Spezifität der Lactoferrin-Bindung.....	59
4.2.4	Untersuchung der Bindungsaffinität von Lactoferrin an <i>S. pneumoniae</i>	60
4.2.5	Kompetitive Inhibition der Lactoferrin-Bindung durch PspA.....	62
4.2.6	Bestimmung der Bindungsdomäne bei PspA für humanes Lactoferrin.....	63
4.2.7	Funktionelle Analyse der Bindung von humanem Lactoferrin an Pneumokokken....	68
4.2.7.1	Überprüfung spezifischen Proteininduktion beim Wachstum unter eisenlimitierenden und -substituierten Bedingungen.....	68
4.2.7.2	Nutzung von humanem Lactoferrin als Eisenquelle beim Wachstum von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	70
4.2.7.3	Konstruktion einer <i>pspA</i> -negativen Insertionsmutante.....	73
4.2.7.4	Überprüfung des Insertionsereignisses von pJDC9:: <i>pspA</i> in <i>pspA</i> von R6...75	
4.2.7.4.1	Southern-Blot Analysen.....	75
4.2.7.4.2	Western-Blot Analysen.....	76
4.2.7.4.3	PCR-Analysen.....	76
4.2.7.5	Untersuchung der Lactoferrin-Bindungsaktivität von R6- <i>pspA</i> ⁻	77

4.2.7.6	Nutzung von humanem Lactoferrin als Eisenquelle beim Wachstum von R6- <i>pspA</i> ⁻	78
4.2.7.7	Untersuchung der proteolytischen Aktivität von <i>S. pneumoniae</i> und R6- <i>pspA</i> ⁻ gegenüber humanem Lactoferrin.....	79
4.2.7.8	Untersuchung der proteolytischen Aktivität von PspA von <i>S. pneumoniae</i>	82
4.2.7.9	Vergleich der Proteinsequenz von PspA verschiedener <i>S. pneumoniae</i> -Stämmen.....	84
5	Diskussion.....	87
6	Literaturverzeichnis.....	102
7	Anhang.....	128
6.A	Abkürzungsverzeichnis.....	128
6.B	Chemikalienliste.....	131
6.C	Firmennachweis.....	133
6.D	Herstellernachweis der Laborgeräte.....	134
6.E	Stämme von <i>E.coli</i> , <i>GBS</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> und <i>Streptococcus pneumoniae</i>	135
6.F	Verbrauchsmaterialien.....	138
6.G	Längenstandards für DNA und Proteine.....	138
6.H	Vektor-Ansicht.....	139
6.I	Adressen von web-Seiten.....	140

Publikationsliste

Lebenslauf

Danksagung

1 Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae ist ein sehr wichtiger humanpathogener Erreger, der zu den häufigsten Erregern von Pneumonien und Otitis media, aber auch von Sepsis, Sinusitis und Meningitis gehört. Da der bislang verwendete Pneumokokkenimpfstoff wegen seines Polysaccharidcharakters nur 'suboptimal' ist, sollte ein bei Pneumokokken ubiquitär vorhandenes Oberflächenprotein als Impfstoffkandidat identifiziert werden. Aufgrund eines speziellen, cholinvermittelten Verankerungsmechanismus einiger Oberflächenproteine von Pneumokokken gelang es aus einer chromosomalen Genbank mehrerer dieser sogenannten cholinbindenden Proteine (Cbp) bzw. deren Gene zu isolieren. Allerdings handelte es sich bei den soweit sequenzierten Klonen um die bereits bekannten Gene *spsA*, *pspA*, *pcpA* und *lytA*. Aufgrund der Veröffentlichung der Genomsequenz eines Pneumokokkenstammes im Internet, wurde weiterhin eine Computer-unterstützte Genomanalyse durchgeführt. Wegen der relativ stark konservierten Repeatstruktur der bisher bekannten cholinbindenden Proteine konnten 6 weitere Cbp identifiziert werden. Das mit 627 Aminosäuren größte Protein (P4139) wurde kloniert und im *E. coli* System exprimiert. Immunfluoreszenzversuche ergaben die Oberflächenlokalisierung dieses Proteins. Eine schwache Bindung von IgG und humanem Fibrinogen konnte im Western-Blot nachgewiesen werden, allerdings steht die weitere funktionelle Analyse aus.

Neben der Suche nach potentiellen Impfstoffkandidaten ist das detaillierte Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt im Verlauf eines Infektionsprozesses zur Beurteilung eines Impfstoffkandidaten sehr wichtig. Bei der Kolonisierung des Wirtes ist die Aufnahme von essentiellen Nahrungsbestandteilen, wie Eisen, eine Grundvoraussetzung. Extrazelluläres Eisen ist an Eisentransportproteine wie Transferrin im Serum und Lactoferrin in mukösen Sekreten gebunden. Mit dieser Arbeit gelang der Nachweis, daß *S. pneumoniae* humanes Lactoferrin als einzige Eisenquelle zum Wachstum unter eisenlimitierenden Bedingungen verwenden kann. Pneumokokken binden ausschließlich humanes Lactoferrin, das ihre Wirtsspezifität belegt. Die Nutzung von Eisen zum Wachstum konnte sowohl für Blutisolate und Isolate des Nasopharynx gezeigt werden. Der bakterielle Ligand zur Bindung von humanem Lactoferrin wurde identifiziert. Es handelt sich um das seit Jahrzehnten bekannte 'pneumococcal surface protein A' (PspA). PspA-Deletionsmutanten bestätigten PspA als Lactoferrin-bindendes Protein. Mit der Methode der SPOT-Membran konnte die

Lactoferrin-Bindungsdomäne von PspA auf das 15er Peptid 'YFKEGLEKTIAAKKA', von Aminosäure 291 bis 305 (NCTC 7978, Serotyp 3), eingegrenzt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Mechanismus der Eisenaufnahme über die proteolytische Spaltung von humanem Lactoferrin erfolgt. Mit einem sogenannten 'Fest-Phasen-Protease-Versuch', bei dem radioaktiv-markiertes humanes Lactoferrin immobilisiert wurde, und Wachstumsversuchen mit ^{125}I -hLf konnte die proteolytische Aktivität von PspA gegenüber Lactoferrin zum ersten Mal nachgewiesen werden. Die Proteolysedomäne ist zwischen Aminosäure 105 und 167 lokalisiert. Die Spaltung des Lactoferrins führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung des Moleküls und damit Freisetzung des Eisens. Mit der PspA-Deletionsmutanten und einer Proteolyse-Defekt-Mutanten konnte gezeigt werden, daß die Proteolyse gegenüber der Bindung des Lactoferrins der wachstumslimitierende Schritt ist. Obwohl die Deletionsmutante kein hLf mehr band, konnte ein Wachstum mit Lactoferrin beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, konnte die Proteolyse-Defekt-Mutante zwar Lf binden, jedoch nicht mehr wachsen.

2 Einleitung

2.1 Die Gattung *Streptococcus* im System der Prokaryonten

Die Gattung *Streptococcus* wird zu der Sektion der Gram-positiven Kokken gezählt. Hierzu gehören die Familien der Micrococcaceae und der Deinococcaceae mit anderen Gattungen. Zu diesen anderen Gattungen gehören neben den Enterokokken und Lactokokken auch die Streptokokken. Erstmals wurden 1874 kettenförmige Kokken als ‘Streptokokken’ in der Literatur beschrieben (Billroth). Seit 1919 werden Streptokokken hinsichtlich ihres Hämolyseverhaltens eingeteilt: *i*) α -hämolisierend: Bakterien, die bei der Kultivierung auf Blutagar eine unvollständige Hämolyse aufweisen, da Hämoglobin nur zu dem Abbauzwischenprodukt Methämoglobin reduziert wird, und oft eine damit einhergehende sogenannte ‘Vergrünung’ ihrer Umgebung bewirken; *ii*) β -hämolisierend: Bakterien, die eine vollständige Hämolyse aufweisen, wobei keine intakten Erythrozyten mehr vorhanden sind und das Hämoglobin durch Streptolysin O und/oder Streptolysin S vollständig abgebaut wird und *iii*) γ -hämolisierend: Bakterien, die keine Hämolyse aufweisen (Brown, 1919). Anfang der 30er Jahre erfolgte eine weitere Differenzierung der Streptokokken aufgrund unterschiedlicher polymerer Kohlenhydrate, die in der Zellwand lokalisiert sind. Die Antigene der verschiedenen immunologischen Gruppen wurden zunächst mit den Buchstaben A-E gekennzeichnet (Lancefield, 1933). Später gefundene Antigene erweiterten das System entsprechend bis V (Kayser *et al.*, 1993). Die Energiegewinnung erfolgt bei Streptokokken durch Fermentation von Glukose und Lactose unter Säurebildung und werden zu den Milchsäurebakterien gezählt (Schlegel, 1992). Allgemein zeichnen sich die Streptokokken durch einen hohen Bedarf an Supplinen und Nährstoffen aus. Dieser hohe Nährstoffanspruch und die Art der Energiegewinnung steht im direkten Zusammenhang mit ihrer Verbreitung: Streptokokken sind vor allem in Milch, auf Haut, sowie Darm und Schleimhäuten angesiedelt. Viele Streptokokken sind harmlose Kommensalen, jedoch gibt es ebenfalls hoch virulente Krankheitserreger, die sowohl bei Tieren als auch beim Menschen schnell zum Tode führen können. Zu den humanen Krankheitserregern gehört die Art *Streptococcus pneumoniae*.

Bislang konnten bei Pneumokokken keine Antigene identifiziert werden, die zur Einteilung in einer der Lancefield-Gruppen führten (Kreig und Holt, 1986). Eine Klassifizierung von *S. pneumoniae* erfolgt aufgrund der chemischen Feinstruktur der Kapselpolysaccharide, die zur

sogenannten ‘Dänischen Nomenklatur’ mit bisher 90 Serotypen führte (Lund und Henrichsen, 1987; Henrichsen, 1995).

2.2 Die Art *Streptococcus pneumoniae*

Im Jahre 1881 gelang es George Sternberg zum ersten Mal Pneumokokken von einem gesunden Träger zu isolieren. Pneumokokken gehören zur natürlichen Flora des oberen menschlichen Respirationstraktes und nahezu alle Kleinkinder in den ersten beiden Lebensjahren, sowie bis zu 50% der gesunden Erwachsenen zählen zu den asymptomatischen Keimträgern (Austrian, 1986). Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um ovale bis lanzettförmige Kokken, die meist in Paaren und gelegentlich in kurzen Ketten vorkommen. Aufgrund der morphologischen Anordnung in Paaren, wurden Pneumokokken zunächst als *Diplococcus pneumoniae* in der Literatur beschrieben (Fraenkel und Weichselbaum, 1886). Pneumokokken sind bekapselt, unbeweglich und nicht-sporulierend. Sie benötigen zum optimalen Wachstum Serum- bzw. Blutbestandteile im Nährmedium; ihr Wachstumsoptimum liegt bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5-10% und einem pH-Wert von 7.4. Auf Blutagarplatten zeigen sie mittelgroße, glattrandige Kolonien, die bei älteren Kolonien eine besondere morphologische Veränderung aufweisen: sie zeigen eine zentrale Vertiefung aufgrund einhergehender Autolyse. Stämme des Serotyps 3 und 35A (Dänische Nomenklatur) weisen aufgrund ihrer dicken Schleimkapsel ein mukoides Wachstum auf (Hoeprich *et al.*, 1994). *S. pneumoniae* gehört zu den vergrünenden Streptokokken und ist anaerob bis mikroaerophil. Von anderen α -hämolyisierenden Streptokokken ist *S. pneumoniae* durch seine Gallelöslichkeit und Optochinon-sensitivität zu unterscheiden (Murray *et al.*, 1990).

2.3 Von *S. pneumoniae* verursachte Krankheiten und deren Problematik

Die World Health Organisation (WHO) gibt in ihrem Jahresbericht den Prozentsatz der weltweiten Todesfälle aufgrund von Infektionskrankheiten mit 33% an, wobei der Ansteckungsweg von Mensch-zu-Mensch mit 65% die bedeutendste Rolle spielt (The World Health Report, 1996). Hierzu gehören Pneumokokkeninfektionen, deren Verbreitung durch eine Tröpfcheninfektion erfolgt. Pneumokokken besiedeln vorwiegend die oberen Schleimhäute des Oropharynx und es wird angenommen, daß in Nordamerika bis 1,5 Mio. Pneumonien pro Jahr durch *S. pneumoniae* verursacht werden (200-500 Fälle pro 100.000 Einwohner) (Hoeprich *et al.*, 1994).

S. pneumoniae ist allgemein einer der weltweit häufigsten Verursacher von bakteriellen Infektionen und führt vor allem bei Kleinkindern bis zu 2 Jahren, bei Personen über 60 Jahren, sowie bei immun-supprimierten Personen, besonders bei AIDS-Patienten (Simberkoff *et al.*, 1984), häufig zum Tode (Gray *et al.*, 1979; Siber, 1994; Ridgway *et al.*, 1995). Dieses liegt an dem besonderen Immunstatus dieser Risikogruppen und korreliert mit der Inzidenz der Erkrankungen. Bislang zeigten skandinavische und nordamerikanische Untersuchungen, daß die Häufigkeit bakteriämischer Pneumokokkeninfektionen unter Säuglingen und Kleinkindern am höchsten ist (45,3 bis 97 Fälle pro 100.000 Einwohner) und bis zur Pubertät auf 8,9 pro 100.000 Einwohner abfällt (Istre *et al.*, 1987; Eskola *et al.*, 1992). Die Inzidenz der Infektionen nimmt dann wieder bei Erwachsenen über 60 Jahren zu (87 Fälle pro 100.000 Einwohner) (Istre *et al.*, 1987; Fedson *et al.*, 1988).

Pneumokokken sind mit 15-50% die häufigsten Verursacher von nicht-nosokomial erworbenen Pneumonien (Austrian, 1984; Johnston *et al.*, 1991); der zweit-häufigste Erreger von Pneumonien ist *Haemophilus influenzae* mit 4-11% (Hoeprich *et al.*, 1994). Weiterhin sind bei Erwachsenen Pneumokokken nach *Neisseria meningitidis* die Hauptverursacher bakterieller Meningitis (Austrian, 1984). Auch bei den Nosokomialinfektionen weisen die Pneumokokken als Verursacher von Pneumonien einen hohen Anteil auf (Halle, 1998). Desweiteren ist *S. pneumoniae* einer der häufigsten Erreger von Otitis Media, Bakteriämien, Septikämien und Sinusitis (Degan *et al.* 1994; Tuomanen *et al.*, 1995). Untersuchungen in den USA ergaben, daß fast jedes Kind im Alter von 5 Jahren an mindestens einer Pneumokokkeninfektion des Mittelohrs erkrankt war (Tuomanen *et al.*, 1995). Seltene Folgeerkrankungen einer Infektionen sind Endokarditis, Arthritis und Peritonitis (Zielen *et al.*, 1997). Trotz der zur Verfügung stehenden Antibiotika liegt die Mortalität bei den durch *S. pneumoniae* verursachten Erkrankungen auf einem konstant hohen Niveau (Gillespie, 1989). Daten belegen, daß 5% der Pneumokokken-Pneumonien und bis zu 30% der Pneumokokken-Meningitiden letal verlaufen (Mufson, 1990). Weltweit werden die Todesfälle auf mehr als 1 Million pro Jahr beziffert (Siber, 1994). Die Problematik bei der Behandlung von Pneumokokkeninfektionen ergibt sich aus der weltweit verstärkt auftretenden Antibiotikaresistenz der Pneumokokkenstämme. Seit den 70er Jahren wird eine Zunahme der Penicillin-resistenten Pneumokokken beobachtet (Jacobs *et al.*, 1978), wobei hochresistente Stämme (Minimale Hemmkonzentration (MHK) > 1 mg/l) vor allem in Rumänien (25% in 1991), Spanien (44% in 1989), Ungarn (58%, 1988-1989) und Singapur (41%, 1997-1999) nachgewiesen wurden (Baquero *et al.*, 1991; Appelbaum, 1992; deNeeling, 1996; Soh *et al.*, 2000). Für Spanien wurde ein enger

Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Penicillin und dem Auftreten von Penicillin-resistenter Pneumokokken beobachtet (Baquero *et al.*, 1991).

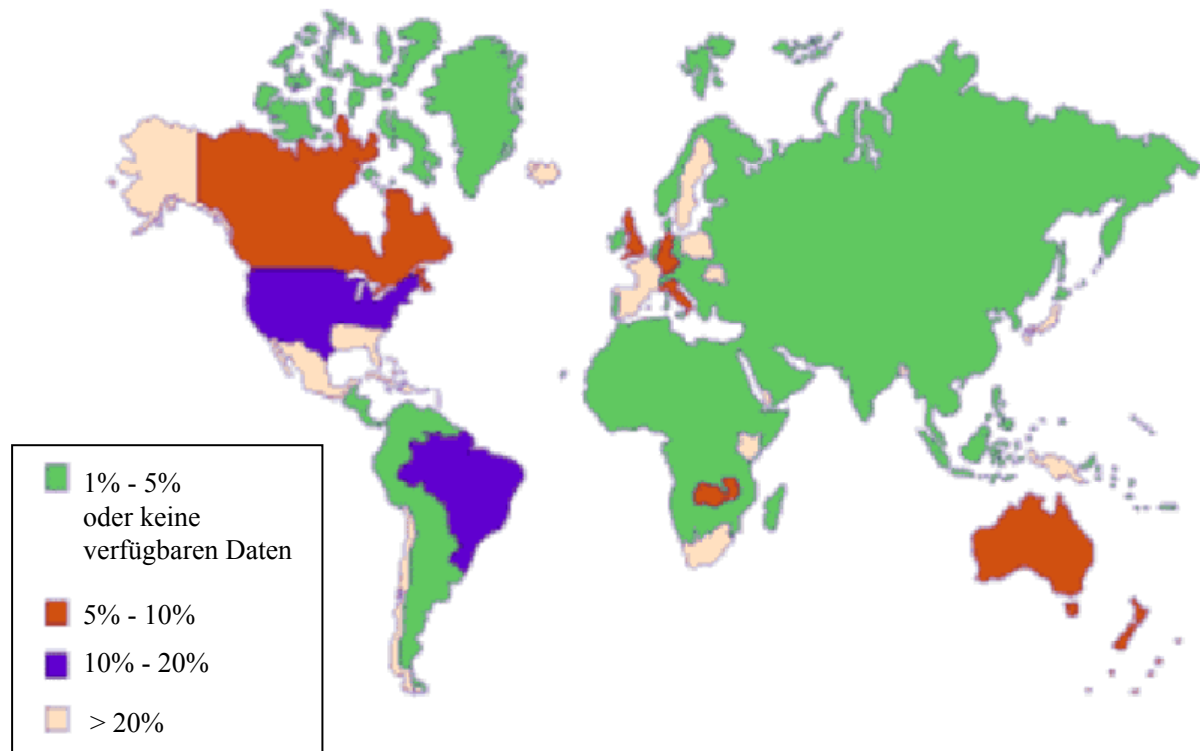


Abbildung 1: Verbreitung Penicillin-resistenter Pneumokokken in der Welt (deNeeling, 1996).

Ein Vergleich der Serotypen der auftretenden Penicillin-resistenten Pneumokokken ergab, daß in Südafrika, Spanien, Ungarn und Frankreich nahezu die gleichen Stämme vom Serotyp 6, 9, 14, 19 und 23 auftraten. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß sich der resistente Serotyp 23F von Spanien nach Frankreich und die USA ausbreitete (Tomasz, 1991). Der Mechanismus der Resistenz gegenüber dem β -Laktam-Antibiotikum Penicillin erfolgt bei den Pneumokokken nicht über die Produktion von β -Laktamasen, sondern durch eine veränderte Form der Penicillin-bindenden Proteine (PBP), die normalerweise an der Biosynthese des Mureins beteiligt sind. Aufgrund dieser Veränderung werden die β -Laktam-Antibiotika mit verminderter Affinität gebunden (Hakenbeck *et al.*, 1980; Handwerger und Tomasz, 1986). Besonders besorgniserregend ist das Auftreten von Pneumokokken, die eine vielfache Resistenz gegenüber mehrere Antibiotika aufweisen. Diese sogenannten ‘multiple resistant *S. pneumoniae*’ (MRSP) sind gegen Penicillin G und mindestens zwei weitere Antibiotika - meist Chloramphenicol und Tetracyclin - resistent (Jacobs *et al.*, 1978; Klugman, 1990). In Singapur sind 95% des am meisten Isolierten Serotyps 19F resistent gegen mehrere Antibiotika (Suh *et al.*, 2000). Ebenso wurde eine Resistenzentwicklung gegenüber sogenannte

Cephalosporine der 'dritten Generation' beobachtet (Munoz *et al.*, 1992). Zwar finden sich in Deutschland bisher nur vereinzelt hochresistente und in 1,4% intermetiär resistente Isolate (Reinert *et al.*, 1994), doch ist aufgrund zunehmender Tourismusaktivitäten mit einer Verbreitung der hochresistenten Stämme zu rechnen. Erschwerend kommt hinzu, daß Pneumokokken eine natürliche Kompetenz aufweisen und somit der horizontale Gentransfer vereinfacht ist (Avery *et al.*, 1944).

Eine Problematik der Behandlung von Meningitiden ergibt sich zusätzlich bei der Anwendung von Antibiotika bei eigentlich Antibiotika-sensitiven Stämmen. Der Einsatz von β -Laktam-Antibiotika bei Infektionen mit *S. pneumoniae* führt in ca. 30% der zu behandelnden Kinder zum Tode bzw. es verbleiben permanente, irreversible Gehirnschäden (Tuomanen, 1993). Aufgrund der Lyse der Bakterien und der Exposition von bakteriellem Zellwandmaterial kommt es zu einer verstärkten Entzündungsreaktion. Diese führt zu einem sehr hohen interkranialen Druck und im weiteren Verlauf zu einer Schwellung des Gehirns, daß in irreversible Hirnschäden bzw. dem Tod resultieren kann (Bohr *et al.*, 1985; Tuomanen *et al.*, 1985).

Die klinische Bedeutung der Pneumokokkeninfektionen und die Gefahr der zunehmenden Antibiotikaresistenzen verdeutlichen, daß eine Impfung gegen Pneumokokken verstärkt zur Prävention einzusetzen ist (Baquero *et al.*, 1991).

Die häufigsten Serotypen von Pneumokokkeninfektionen sind 1, 3, 6, 13, 14, 19 und 23 in Erwachsenen und 3, 6, 14, 18, 19 und 23 in Kindern (Cowan *et al.*, 1978). Bis auf den Serotyp 13, der nicht bei Kindern beobachtet wurde, konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Serotyp der Infektion aufgezeigt werden (Austrian, 1978; Gray *et al.*, 1979, Rapola, *et al.*, 1997). Desweiteren lassen sich die über 90 verschiedenen Serotypen in 48 nicht-kreuzreaktive Polysaccharidgruppen einteilen (Henrichsen, 1995). Anhand dieser Daten wurde ein Impfstoff entwickelt, der zunächst 7 Polysaccharide, dann 14 und seit 1983 die 23 häufigsten Kapselpolysaccharide in einem 23-valenten Impfstoff vereinigt. Dieser Impfstoff (Pneumovax[®]) wird zur Zeit für eine aktive Immunisierung verwendet (Shapiro *et al.*, 1991). Diese 23 verschiedenen Serotypen sind zu 85% - 90% die Hauptverursacher von bakteriämischen Infektionen in Europa und der USA (Robbins, 1983). Die erlangte Immunität ist allerdings für bestimmte Risikogruppen nicht ausreichend, da kein langfristiger Immunschutz erzielt wird (Van Dam *et al.*, 1990). Zu den Hauptrisikogruppen gehören Kleinkinder, ältere Menschen, sowie Patienten mit polysaccharidspezifischem Immundefekt (PSI) (Douglas und Miles, 1984; Forrester *et al.*, 1987). Bei der Immunisierung mit

Polysacchariden erfolgt keine Stimulation der T-Helferzellen, sondern es erfolgt eine T-Zell-unabhängige Immunantwort. Bedingt dadurch werden keine Gedächtniszellen angelegt, die bei einer wiederholten Infektion durch Pneumokokken von Bedeutung sind (Stein, 1992). Die Gefahr bei Kleinkindern ist, daß die Klasse der Immunglobuline G2 (IgG2) sich erst im Alter von etwa 2 Jahren entwickelt und diese die Haupt-Antikörper-Klasse gegen Polysaccharide ist (Cowan, *et al.*, 1978, Breukels *et al.*, 1999). Als Grund für die späte Entwicklung dieser Anti-körper wird die Kreuzreaktivität von Polysialinsäuren und den bakteriellen Polysacchariden diskutiert. Glykoproteine mit Sialinsäuren wurden im humanen embryonalen Gehirn, jedoch nicht bei Erwachsenen gefunden. Eine fehlende Antwort auf Polysaccharidantigene verhindert somit Autoimmunantikörper gegen sich entwickelndes Gewebe (Finne *et al.*, 1983; Finne *et al.*, 1987; Hayrinen *et al.*, 1995). Der Impfstoff Pneumovax® kann daher ausschließlich bei Erwachsenen angewendet werden (Alonso DeVelasco, 1995; Rijkers, 1995). In einer Studie des 'Institute of Medicine' wurde eine 'Hitliste' der Impfstoffe für das 21. Jahrhundert erstellt. In dieser Liste steht ein Impfstoff gegen *S. pneumoniae* für Klein-kinder und über-65 Jahre-alte Personen in der Kategorie mit der höchsten Priorität (Fox, 1999).

Aufgrund der verringerten Effektivität des vorhanden Impfstoffs bei den Risikogruppen, Probleme bei der Antibiotikatherapie und der steigenden Anzahl Antibiotika-resistenter Pneumokokkenstämme, wendet sich die Forschung verstärkt der Identifizierung neuer Vakzin-kandidaten zu (Austrian, 1999). Die erste Strategie war, die Polysaccharidantigene an Proteine zu konjugieren, um eine T-Zell-abhängige Immunantwort zu erhalten. T-Zell-abhängige Antigene wirken auch in Kleinkindern immunogen und führen zu Gedächtniszellen (Insel und Anderson, 1986; Steinhoff, *et al.*, 1994). Vielversprechend sind Proteine, die stark immunogen sind. Hierzu gehören die 'outer membrane protein' (OMP) von *Neisseria meningitidis*, sowie das Tetanus-Toxoid von *Clostridium tetani* und das Diphtherie-Toxoid von *Corynebacterium diphtheriae*, die bereits bei der Entwicklung eines Polysaccharid-Protein-Impfstoffes gegen *Haemophilus influenzae* type b (Hib) erfolgreich waren (Eskola *et al.*, 1985; Takala *et al.*, 1991; Vadheim *et al.*, 1993; Kamboj *et al.*, 2001). Mit diesen Proteinen wurden Polysaccharide verschiedener Serotypen von *S. pneumoniae* gekoppelt und die Versuche ergaben, daß die Konjugate auch bei Säuglingen protektive Antikörper hervorbrachten (Vella *et al.*, 1992; Käythy *et al.*, 1995; Käythy und Eskola, 1996; Shelly *et al.*, 1997; Anttila *et al.*, 1998). Allerdings wird immer häufiger diskutiert, ob der vermehrte Einsatz von Tetanus- und Diphtherie-Toxoid nicht zu einer Abschwächung aufgrund sich ausbildender Toleranz führen kann und eventuell diese Toxoide, wenn sie zur eigentlichen Impfung gegen Tetanus und

Diphtherie eingesetzt werden, nicht mehr wirksam sind. Ein weiterer Nachteil des Tetanus-/Diphtherie-Konjugates ist, daß bei einer Konjugation von Polysacchariden mit einem Protein maximal 11 von 90 verschiedenen Polysacchariden eingeschlossen werden können. Dieses reduziert zum einen die Effektivität gegen verschiedene Serotypen und ist zum anderen kostenintensiv und daher als Impfstoff gerade in den Entwicklungsländern limitiert (Paton, 1998). Ebenfalls wurde bei der Verwendung des Polysaccharidimpfstoffs beobachtet, daß nach einer Immunisierung Pneumokokken-infektionen auftraten, deren Serotyp nicht in dem Impfstoff enthalten waren (Lipsitch, 1999 und 2001). Der Impfstoff PCV[®], eine Konjugat von 7 verschiedenen Polysaccharidketten mit einem Diphtherie-Toxoid (CRM 197), führte bei Kleinkindern von 2 bis 15 Monaten zu IgG2-Antikörpern und anschließend zur Reduktion einer invasiven Erkrankung und Auftreten von Otitis media (Breukels *et al.*, 1999; Shinefield *et al.*, 1999; Black *et al.*, 2000, Eskola *et al.*, 2001). Allerdings führte die Verwendung eines Konjugates von 5 verschiedenen Polysaccharidketten mit CRM 197 bei älteren Menschen zu keiner gesteigerten Immunantwort und ist somit ineffektiv (Shelly *et al.*, 2001).

Diese Problematik könnte mit einem ubiquitär auf alle Serotypen verteilten Pneumokokkenprotein behoben werden, da die Effektivität des Vakzins im Idealfall 100% betragen würde. Die aussichtsreichsten Kandidaten hierfür sind oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren. Die Oberflächenproteine werden vom Immunsystem erkannt, ohne das die Bakterienzelle zuvor lysiert werden muß und somit wird die beschriebene ‘Zell-Lyse-Toxizität’ vermieden. Der Begriff ‘Virulenzfaktoren’ beinhaltet, daß es sich um Strukturen handelt, die für den Organismus zum Erlangen seiner Pathogenität essentiell sind. Ebenso müssen die funktionellen Domänen des Proteins konserviert und daher bei allen Serotypen zu finden sein.

Neueste Untersuchungen haben drei bereits bei Pneumokokken identifizierte Oberflächenproteine in Immunisierungsstudien kombiniert. Hierbei handelt es sich um das ‘pneumococcal surface protein A’ (PspA), ein Derivat des Pneumolysins (PdB) (Alexander *et al.*, 1994) und das metallbindende Lipoprotein PsaA. Die Infektionsversuche im Mausmodell zeigten, daß die Kombination dieser drei Proteine eine verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zu einer Immunisierung mit den einzelnen Proteinen aufwies, nicht Serotyp-spezifisch war und auch eine passive Immunität vermittelte (Ogunniyi *et al.*, 2000).

2.4 Oberflächenstrukturen und Pathogenitätsfaktoren von

S. pneumoniae

Bei den bisher charakterisierten Virulenzfaktoren handelt es sich um Zelloberflächenstrukturen und um zytoplasmatische Proteine, deren Funktion in der Adhäsion und Invasion von humanen Epithelzellen sowie der Resistenz gegenüber der humanen Immunabwehr ist.

Als ein Hauptvirulenzfaktor gelten die Kapselpolysaccharide. Die Kapsel besteht aus repetitiven Oligomeren, die über Phosphodiesterbindungen verknüpft sind. Die Polysaccharide können weiterhin Zuckeralkohole, Aminosucker, Choline, Di- und Trideoxyhexosen, sowie Acetyl- und Phosphorylgruppen enthalten (Van Dam *et al.*, 1990). Studien zeigten eine deutliche Assoziation der Kapsel mit der Virulenz der Pneumokokken, wobei nichtbekapselte Varianten eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber Phagozytose zeigten (Avery und Dubois, 1931). Das Ergebnis einer intranasalen Immunisierung von Mäusen mit bekapselten und unbekapselten *S. pneumoniae* Stämmen zeigte, daß die unbekapselten Bakterien sehr schnell abgetötet wurden und die Mäuse die Infektion überlebten. Die bekapselten Stämme waren ca. 10^5 mal virulenter (Watson und Musher, 1990). Dabei ist weniger die Stärke als vielmehr die chemische Struktur des Kapselpolysaccharids für die Hemmung der Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten verantwortlich (Fine, 1975). Ebenso wird durch die Kapsel eine Opsonisierung (Chudwin, *et al.*, 1985) und somit Aktivierung der alternativen Komplementkaskade verhindert (Alonso deVelasco *et al.*, 1995).

Die Zellwand der Pneumokokken entspricht dem allgemeinen Aufbau Gram-positiver Bakterien. Das Peptidoglukangerüst setzt sich aus Ketten von in alternierender Folge verknüpfter N-Acetylmuraminsäuren und N-Acetylglukosaminen zusammen. Diese einzelnen Muraminsäureglieder sind über Aminosäuren peptidisch verknüpft (Schlegel, 1992). Die Zellwand ist bei unbekapselten Pneumokokken an der Adhäsion an humane Endothelzellen beteiligt, indem es eine 'Pro-Koagulant-Aktivität' (PCA) auf humanen Endothelzellen induziert (Geelen *et al.*, 1993).

Weitere Bestandteile der Zellwand sind Teichonsäuren. Einige Streptokokken- und Clostridien-Arten weisen bei den Teichonsäuren einen einzigartigen Phosphorylcholinrest auf. Das Phosphorylcholin stellt die Bindungsstelle für das C-reaktive Protein (CRP) des menschlichen Serums dar (Agrawal *et al.*, 1992). Es ist der immunogenste Teil der Zellwand und für die bereits beschriebenen Entzündungsprozesse im Verlauf einer Pneumokokken-infektion verantwortlich (Hummel, *et al.*, 1985; Russell *et al.*, 1990). Aufgrund der Bindung des CRP kommt es zur Opsonisierung der Bakterien und Aktivierung der Komplementkaskade

(Winkelstein und Tomasz, 1977 und 1978). Die Produktion von Interleukin-1 von Monozyten und damit die 'akute Phase'-Reaktion wird stimuliert und die Phagozytose verstärkt (Bornstein, 1982; Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß das C-reaktive Protein einen partiellen Schutz vor einer Pneumokokkenbakterämie vermittelt (Szalai *et al.*, 1995; Szalai *et al.*, 1996). Phosphorylcholin als Bestandteil der Plasmamembran-assoziierten Lipoteichonsäure (LTA) stellt zum anderen die Bindungsstelle für die sogenannten cholinbindenden Proteine der Pneumokokken dar (Gotschlich und Liu, 1967; Leon und Young, 1971; Briese und Hakenbeck, 1985; Garcia *et al.*, 1994). Die LTA wird ebenfalls als Forssman Antigen bezeichnet (Horne und Tomasz, 1985).

Ebenso sind in der Zellwand Sialinsäuren zu finden, die auch bei weiteren Meningitis-Erregern wie Gruppe B Streptokokken (GBS) (Wessels *et al.*, 1989) und den humanpathogenen *Neisseria* Spezies eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen. Bei Meningokokken vermitteln sie eine Resistenz gegenüber dem Immunsystem, indem sie die Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems regulieren (Ram *et al.*, 1998). Weitere Oberflächenstrukturen sind Proteine, die entweder sekretiert oder gebunden vorliegen. Eine vereinfachte graphische Darstellung der Zellwand ist in *Abbildung 2* gezeichnet.

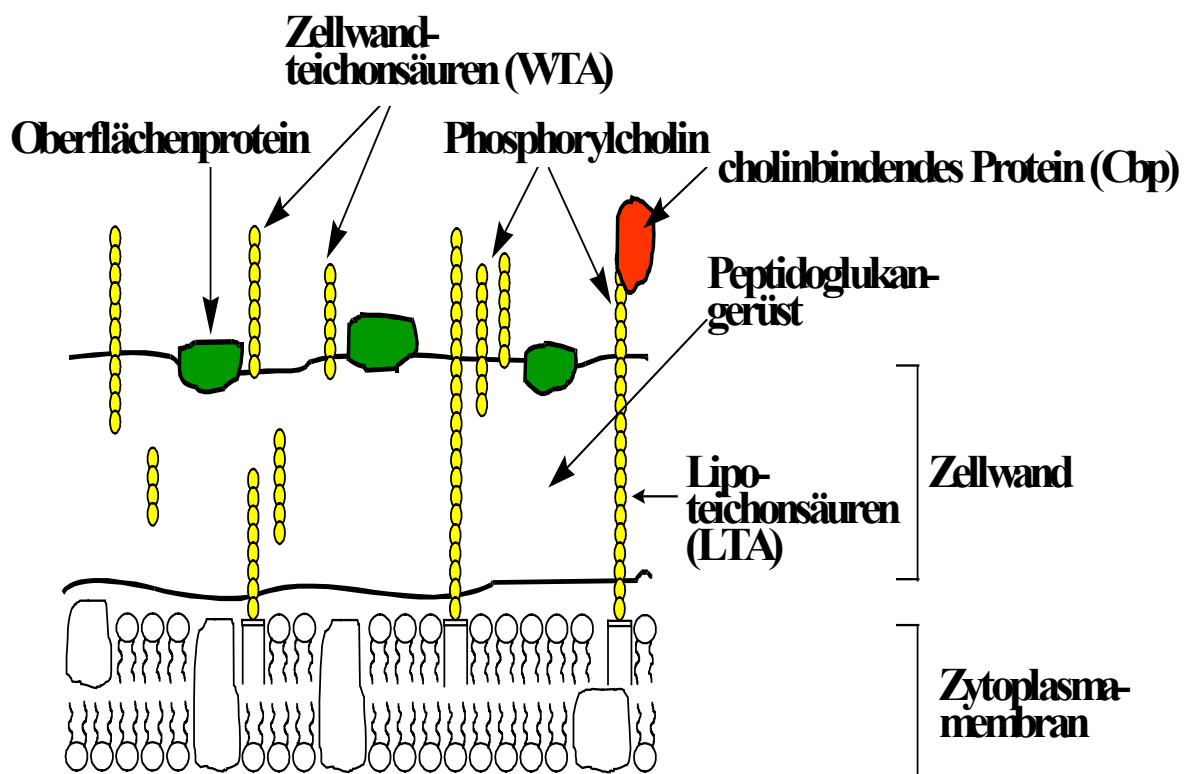


Abbildung 2: Vereinfachte graphische Darstellung der Zellwand mit Teichonsäuren und Proteinen.

Allgemein sind Oberflächenproteine Bestandteile vieler diverser und essentieller Funktionen wie zum Beispiel Fortbewegung, Signaltransduktion, Transport und Aufbau von Makromolekülen und die Aufnahme von essentiellen Nährstoffen. Bei pathogenen Bakterien sind viele Oberflächenproteine Virulenzfaktoren. Beispiele sind zum einen Adhäsine, die eine Kolonisierung und damit Infektion des Wirts erst ermöglichen, und zum anderen Toxine wie das Botulinustoxin von *Clostridium botulinum*, die die Bakterien vor dem Immunsystem des Wirts schützen (Hoepelmann und Tuomanen, 1992). Bei *S. pneumoniae* konnten bisher einige Proteine identifiziert und charakterisiert, doch nur für wenige eine Funktion in der Pathogenese nachgewiesen und damit als Virulenzfaktoren identifiziert werden (Paton *et al.*, 1993; Paton *et al.*, 1997).

Zu den bisher charakterisierten Proteinen gehört die IgA1-Protease, die Immunglobulin A spalten kann und somit der Wirtsabwehr auf mukosalen Oberflächen entgegenwirkt (Male, 1979; Poulsen *et al.*, 1996; Wani *et al.*, 1996). Ebenfalls konnten Peptidpermeasen nachgewiesen werden (AmiA und PlpA), deren Funktion hinsichtlich der Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen diskutiert wird (Cundell *et al.*, 1994; Cundell *et al.*, 1995). AmiA und PlpA könnten entweder direkt als Adhäsine fungieren, oder die Adhärenz durch Steigerung der Expressionsrate von Adhäsinen beeinflussen (Alloing *et al.*, 1989; Cundell *et al.*, 1994; Cundell *et al.*, 1995).

Bei dem 'Pneumococcal adhesin A' (PsaA) wurde zunächst eine Funktion in der Adhäsion angenommen, da Strukturvergleiche Homologien mit anderen potentiellen Adhäsinen von *Streptococcus sanguis* und *Streptococcus parasanguis* ergaben (Sampson *et al.*, 1994). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß *psaA* innerhalb eines Operons liegt, das für ein ABC-Transportsystem kodiert und für den Mangantransport verantwortlich ist (Dintilhac *et al.*, 1997). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß bei einer Immunisierung mit PsaA protektive Antikörper gebildet werden (Talkington *et al.*, 1996) und daß ein Stamm mit einer PsaA-Defekt-Mutation avirulent ist (Berry und Paton, 1996). PsaA wird demnach als Kofaktor für die Genregulation anderer Virulenzfaktoren diskutiert (Dintilhac *et al.*, 1997).

Desweiteren konnte eine Hyaluronidase mit einem Molekulargewicht von 107 kDa identifiziert werden (Berry, *et al.*, 1994), die auch in anderen Streptokokkenspezies gefunden wurde (Boulnois *et al.*, 1991). Hyaluronidasen sind Enzyme, die die Hyaluronsäure, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM), depolymerisieren können (Hymphrey, 1948; Kvetnaia *et al.*, 1995). Diese Funktion ermöglicht es den Pneumokokken sich im Gewebe auszubreiten, wie es für Kollagenasen ebenfalls diskutiert wird (Boulnois, 1992; Harrington, 1996).

Pneumolysin ist ein 52,8 kDa Protein, das Homologien zu Streptolysin O von *Streptococcus pyogenes* und Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* aufweist und zu den thiol-aktivierten Toxinen gehört. Durch Lyse freiwerdendes Pneumolysin bindet an Cholesterol in der Wirtszellmembran und bewirkt in hohen Konzentrationen die Lyse der Wirtszelle durch die Formierung von Transmembranporen. Durch Zerstörung der Zilienzellen im Lungenepithel können Pneumokokken diesen unspezifischen humanen Abwehrmechanismus entgegenwirken (Rubins *et al.*, 1992). In geringeren Konzentrationen stimuliert Pneumolysin die Produktion von Cytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 in humanen Monozyten und führt so neben den Bestandteilen der Zellwand zu einer erhöhten Entzündungsreaktion (Houldsworth *et al.*, 1994). Weitere Funktionen von Pneumolysin sind die Verringerung der bakteriziden Aktivität und Migration der polymorphnukleären Leukozyten (PMN) (Paton und Ferrante, 1983), die Hemmung der Lymphozytenproliferation und Antikörpersynthese (Ferrante *et al.*, 1984) sowie die Stimulation der Komplementkaskade, indem eine Bindung von Pneumolysin an die Fc-Fragmente von Antikörpern erfolgt (Paton *et al.*, 1993). Im Mausmodell ergaben sich bei der Immunisierung mit Pneumolysin protektive Antikörper (Alexander *et al.*, 1994).

Das Enzym Neuraminidase konnte bisher in allen Pneumokokkenisolaten nachgewiesen (Kelly *et al.*, 1967) und als Virulenzfaktor bestätigt werden. Im Mausmodell führte eine Immunisierung mit Neuraminidase zu protektiven Antikörpern gegen *S. pneumoniae* (Lock *et al.*, 1988).

Weitere bakterielle Liganden für die spezifische Bindung von Plasmaproteinen wie Plasminogen (Eno) (Bergmann *et al.*, 2001) und Fibronektin (PavA) (Holmes *et al.*, 2001) konnten bisher identifiziert werden. Fibronektin ist ein Bestandteil der ECM und die Bindung von Pneumokokken an Fibronektin wird als sehr wichtiger Pathogenitätsfaktor für die Anheftung und damit Initiierung der Pneumokokkeninfektion diskutiert (van der Flier *et al.*, 1995). An der Oberfläche gebundenes Plasminogen vermittelt die Migration von Pneumokokken durch die Basalmembran, eine Voraussetzung für die Ausbildung von bakterieller Meningitis (Lahteenmaki *et al.*, 1995; Eberhard *et al.*, 1999).

Eine Übersicht verschiedener Oberflächenproteinen von *S. pneumoniae* ist in der *Tabelle 1* aufgestellt.

Tabelle 1: Oberflächenproteine von *S. pneumoniae*

Oberflächenprotein	Größe	Literatur	Charakterisierung
AmiA	73 kDa	Alloing <i>et al.</i> , 1989	Peptid-Permease
LytA	36 kDa	Garcia <i>et al.</i> , 1986	Autolysin
PavA	35 kDa	Holmes <i>et al.</i> , 2001	Anheftung
NanA	110-140 kDa	Berry <i>et al.</i> , 1988	Neuraminidase A
NanB	65 kDa	Berry <i>et al.</i> , 1996	Neuraminidase B
SpsA	59 kDa	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997,2000	SIgA/SC-Bindung
PcpA	79 kDa	Sanchez-Beato <i>et al.</i> , 1998	nicht bekannt
PcpC	34 kDa	Sanchez-Beato <i>et al.</i> , 1997	nicht bekannt
PlpA	75 kDa	Cundell <i>et al.</i> , 1995	Peptid-Permease
PonA	80 kDa	Martin <i>et al.</i> , 1992	Penicillin-Bdg.-Protein
PsaA	37 kDa	Berry and Paton, 1996	Mangan-Bdg.-Protein
PspA	67-99 kDa	Briles <i>et al.</i> , 1988	nicht bekannt
PspB	64 kDa	McDaniel <i>et al.</i> , 1988	nicht bekannt
Eno	47 kDa	Bergmann <i>et al.</i> , 2001	Plasmin(ogen)-Bindung
SpxB	65 kDa	Spellerberg <i>et al.</i> , 1996	Pyruvat-Oxidase
BgaA	275 kDa	Zahner und Hakenbeck, 2000	β-Galaktosidase

Oberflächenassoziierte Proteine werden zunächst im Zytoplasma synthetisiert und anschließend entweder in die Zellmembran direkt eingebaut oder erst sekretiert und sekundär wieder an der Zellwand gebunden. Typische Verankerungsmechanismen sind in der *Tabelle 2* aufgelistet:

Tabelle 2: Verankerungsmechanismen von Oberflächenproteinen bei Gram-positiven Bakterien und *S. pneumoniae*

Konsensus-Sequenz	Proteine bei Pneumokokken
1. LPXTGX - Motiv	NanA
2. Transmembranproteine	Permeasen des ‘multiple shugar binding’ Transportsystems (MSM)
3. LXXC - Motiv im Amino-terminus	AmiA, PsaA
4. repetitive, cholinsäurebindende Sequenzen im Carboxy-terminus	LytA, PspA, SpsA

Zu den Proteinen, die über das Motiv 'LPXTGX' in der Membran verankert sind und somit eine kovalente Bindung aufweisen (Fischetti *et al.*, 1990; Schneewind *et al.*, 1995), gehören die Neuraminidasen (Cámara *et al.*, 1994). Hierbei handelt es sich um Enzyme, die Sialinsäure von sialoglykosidischen Konjugaten der Wirtszelle abspalten, somit die Viskosität des Mukus herabsetzen (Scalon *et al.*, 1989) und eine Kolonisierung der Epithelzellen ermöglichen (Berry *et al.*, 1988; Lock *et al.*, 1992). Zusätzlich können durch diese Abspaltung auch Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen frei werden, die zur Anheftung genutzt werden können (Anderson *et al.*, 1983).

Transmembranproteine weisen eine Reihe von hydrophoben Segmenten in ihrer Proteinstruktur auf, die den hydrophoben Bereich der Zellmembran durchspannen. Beispiele sind die Permease-Proteine des 'multiple shugar binding' Transportsystems (MSM's) (Russel *et al.*, 1992).

Ebenfalls um eine kovalente Bindung handelt es sich bei den Proteinen, die über die Tetrapeptid-Konsensus-Sequenz 'LXXC' verankert sind. Hierbei ist das Protein an eine Fettsäure, die Palmitinsäure, gebunden und wird daher als Lipoprotein bezeichnet (Gilson *et al.*, 1988; Pearce *et al.*, 1994). Ein Beispiel hierfür ist das Peptidbindungsprotein AmiA. Es gehört zu den bakteriellen Permeasen und ist für den Transport von kleinen Peptiden durch die Zellmembran, sowie für die Resistenz gegenüber Aminopterin verantwortlich (Alloing *et al.*, 1989).

Eine Besonderheit bei Pneumokokken bilden die zellwandassoziierten Proteine, die mittels repetitiver Sequenzen eine nicht-kovalente Bindung zu der Zellwand ausbilden. Hierzu gehören die sogenannten cholinbindenden Proteine (Cbp), die über das Phosphorylcholin der Lipoteichonsäuren (LTA) assoziiert sind (Yother und Briles, 1992).

Zu den bei *S. pneumoniae* identifizierten cholinbindenden Proteinen gehören das Autolysin (LytA), PspA, SpsA und das PcpA. Diese Proteine weisen in ihrem Carboxy-terminalen Bereich repetitive Strukturen von 20 Aminosäuren auf, die innerhalb eines Moleküls und auch zu anderen Proteinen stark konserviert sind (Tabelle 3). Ähnliche Strukturen sind ebenfalls bei Proteinen von *Clostridium difficile*, *Clostridium acetobutylicum* und *Streptococcus mutans* nachgewiesen, so daß der cholinvermittelte Anheftungsmechanismus auch bei anderen Bakterienarten diskutiert wird (Podvin *et al.*, 1988; Wren, 1991; Yother und Briles, 1992; von Eichel-Streiber *et al.*, 1992).

Tabelle 3: Homologienachweis der Repeatstruktur von PspA mit weiteren Proteinen.

Oberflächen- protein	Sequenz	Homologie zu PspA
PspA:	T G W K Q E N - G M W Y F Y N T D G S M - A	
SpsA:	T G W K Q E N - G M W Y F Y N T D G S M - A	93%
LytA:	T G W Q k n D T G Y W Y - v H s D G S Y P K	60%
Cp1:	T G W K Q d S K G - W W F R R N n G S F P Y	60%
CspA:	T G W L k d N - G S W Y y l N a n G a M - A	59%
PcpA:	T G W v k d K - G L W Y y l N E S G S M - A	55%
ToxA:	T G W Q - I D - S k - Y y F N T n - a - - A	44%
Gbp:	N - F f k - D - G k W Y y - - a D G - - l A	39%
GtfC:	T G - v - d g - G Y - Y y - T s - G N - - A	34%

a: abweichende Aminosäure zu der gezeigten Sequenz des PspA-Repeats, ist jedoch identisch mit der Aminosäure eines weiteren Repeats von PspA. **T:** Aminosäuren nicht identisch zu der gezeigten PspA-Sequenz und nicht identisch zu einer weiteren Repeatsequenz. PspA, SpsA, LytA, PcpA: *S. pneumoniae*; Cp1: *S. pneumoniae* Phagen Cp-1; CspA: *Clostridium acetobutylicum*; ToxA: *Clostridium difficile*; Gbp, GtfC: *Streptococcus mutans*.

Bei Gpb und GtfC handelt es sich um sekretierte Proteine, wobei das glukabinbindende Protein (Gpb) von *Streptococcus mutans* als einer der Schlüsselfaktoren für die Virulenz dieser oralen Streptokokken gilt, da das Protein am Zuckermetabolismus beteiligt ist (Banas *et al.*, 1990). Ebenso ist die Glykosyltransferase (GtfC) an der Produktion des extrazellulären Glukans beteiligt. Aufgrund der anti-phagozytischen Funktion des Glukangerüsts und der Erhöhung der Adhärenz von *Streptococcus mutans* ist GtfC ein wichtiges Enzym, das ebenfalls zur Virulenz dieser Streptokokken beiträgt (Ueda *et al.*, 1988).

Bei dem 'clostridial secreted protein A' (CspA) A von *Clostridium acetobutylicum* handelt es sich um ein sekretiertes Protein, dessen Funktion als cholinabhängige Amidase diskutiert wird (Garcia *et al.*, 1988; Sanchez-Beato *et al.*, 1995).

Das Toxin A gehört zu den Hauptvirulenzfaktoren von *Clostridium difficile*. Dieses Enterotoxin zerstört die Epithelzellen im Darm, so daß es zu einer extremen Wasser-ansammlung mit einhergehender, blutiger Diarrhöe kommt, die oft in einer pseudo-membranösen Colitis endet (Dove *et al.*, 1990).

Die bisher identifizierten cholinbindenden Proteinen von *S. pneumoniae* sind wichtige Pathogenitätsfaktoren. Ein Virulenzfaktor ist das Autolysin, das im Mausmodell eine

protektive Immunantwort auslöst (Berry *et al.*, 1989). Bei Autolysin handelt es sich um eine 36 kDa N-Acetylmuraminsäure-L-Alanin Amidase (Höltje und Tomasz, 1976), die über Cholinsäure an die LTA gebunden ist (Briese und Hakenbeck, 1985; Diaz *et al.*, 1992). Dieses Enzym ist für die Zellteilung und für die Autolyse der Pneumokokken bei schlechten Wachstumsbedingungen verantwortlich, indem es die Peptidbindung zwischen Alanin und N-Acetylmuraminsäure hydrolysiert (Garcia, *et al.*, 1986; Lock *et al.*, 1992). Bei der Autolyse werden intrazelluläre Virulenzfaktoren wie Pneumolysin und Neuraminidase frei, die eine Vielzahl toxischer Effekte hervorrufen (Johnson, 1977; Lock *et al.*, 1988; Boulnois, 1992).

Zu den Immunglobulin-bindenden Proteinen gehört das ‘*S. pneumoniae* sekretorische IgA-bindende Protein’ (SpsA) mit einer Größe von 59 kDa (Serotyp 1). Die Bindung von SpsA an SIgA erfolgt über die sekretorische Komponente (SC) (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Die sekretorische Komponente wurde als ein Teil des Poly-Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) identifiziert, der an dimeres IgA und pentamerisches IgM bindet und dadurch die Transzytose durch die mukosalen Epithelzellen ermöglicht (Solari und Kraehenbuhl, 1984). Die SC wird anschließend von dem pIgR abgespalten und allein oder mit dem dimeren IgA sekretiert (Fallgreen-Gebauer *et al.*, 1993). An sekretorisches IgA gebundenes SC verhindert außerdem dessen Proteolyse (Tomasi, 1989). Die Bindung von SpsA an pIgR und eine Verstärkte Adhärenz und Invasion der Pneumokokken an und in Epithelzellen des Nasopharynx konnte beobachtet werden (Zhang *et al.*, 2000). Desweiteren wurde die Bindung des Faktors H des Komplementsystems für SpsA und damit einhergehende Resistenz gegenüber Komplement-Aktivierung und Phagozytose beschrieben (Neeleman *et al.*, 1999; Dave *et al.*, 1999). Das *spsA*-Gen wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen charakterisiert und hier *pspC* oder zunächst *pspA*-ähnlich (McDaniel *et al.*, 1992; Swiatlo *et al.*, 1997) und *cbpA* genannt (Rosenow *et al.*, 1997).

PcpA ist 79 kDa groß und wird als potentiell Adhesin diskutiert (Sanchez-Beato *et al.*, 1998), da es im N-terminalen Bereich sich wiederholende Leucin-reiche Domänen aufweist (LRR: leucine rich repeats), die bereits bei anderen Adhesinen nachgewiesen werden konnten.

Bei dem ‘Pneumococcal Surface Protein A’ (PspA) handelt es sich um ein Oberflächenprotein, das ein Molekulargewicht von 67-99 kDa aufweist und bisher auf allen getesteten Pneumokokkenisolaten nachzuweisen ist (Briles *et al.*, 1988; Crain, *et al.*, 1990; Yother *et al.*, 1992). Obwohl PspA verschiedener Serotypen strukturvariabel ist (Waltman, *et al.*, 1990) und ebenfalls eine unterschiedliche Kombination der exprimierten Epitope aufweist (McDaniel *et al.*, 1992), zeigt PspA eine Kreuz-Protektivität im Infektionsmodell mit mehreren

verschiedenen Kapselserotypen (McDaniel, *et al.*, 1991; Tart, *et al.*, 1996). PspA ist ein hochimmunogenes Protein, das bereits vielfältig im Infektionsmodell (Maus) getestet wurde (McDaniels *et al.*, 1987; Briles *et al.*, 1996). Die Funktion von PspA ist bisher ungeklärt, allerdings konnte gezeigt werden, daß PspA für die Ausprägung der vollen Virulenz nötig ist und daß durch die Anwesenheit von PspA die Pneumokokken länger im Blut persistieren (Briles, *et al.*, 1996; McDaniel, *et al.*, 1997; Nabors *et al.*, 2000). Es konnte beobachtet werden, daß PspA die Anlagerung von C3b an die Bakterienoberfläche verhindert, indem die Ausbildung der C3-Konvertase und damit der alternative Weg der Komplement-Aktivierung inhibiert wird (Tu *et al.*, 1999). Da PspA eine protektive Immunantwort induzieren kann, ist es ein vielversprechender Impfstoffkandidat auf Proteinbasis (Yother und White, 1994) und wird zur Zeit auch in Kombination mit anderen Proteinen - z.B. Pneumolysin - erfolgreich als Impfstoffkandidat untersucht (Berry und Paton, 2000).

In der Abb. 3 ist die Pneumokokkenoberfläche mit verschiedenen Strukturen wiedergegeben, die eine protektive Immunantwort auslösen (Briles *et al.*, 1997).

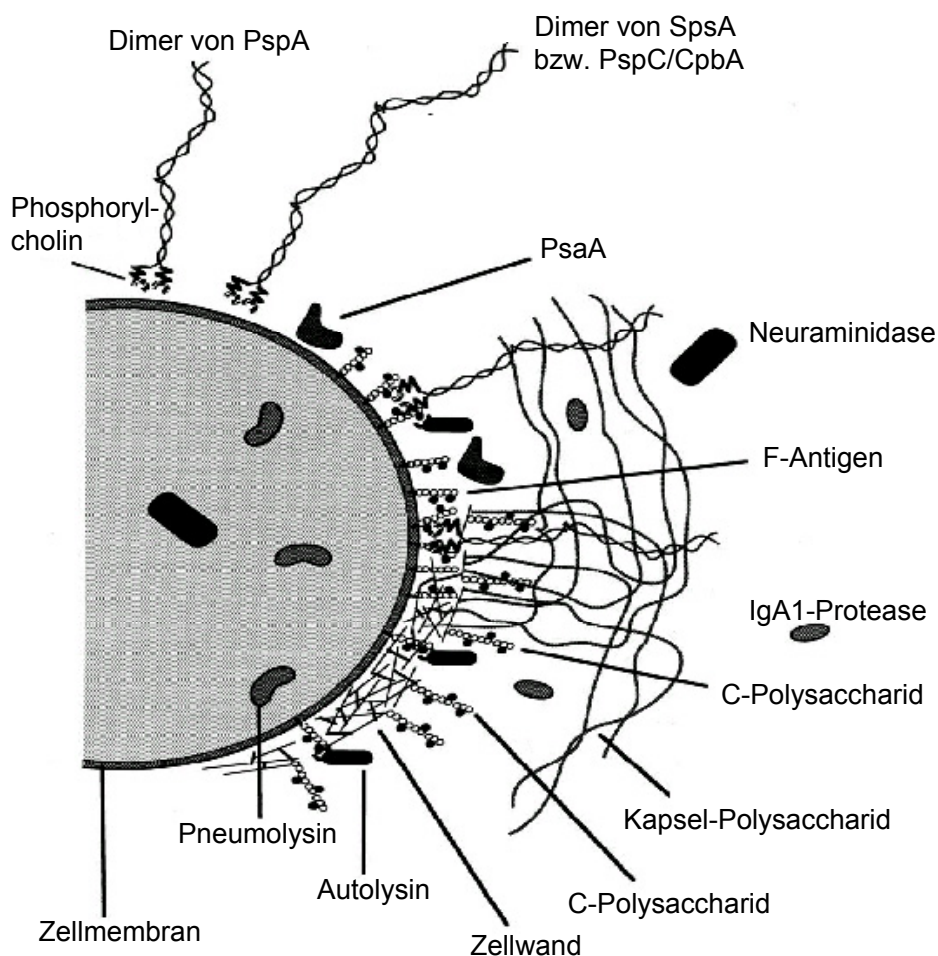


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pneumokokkenoberfläche. Eingezeichnet sind Oberflächenstrukturen, die eine protektive Immunantwort auslösen können (nach Briles *et al.*, 1998).

2.5 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Oberflächenproteine von *Streptococcus pneumoniae* zu identifizieren und charakterisieren. In nachfolgenden Untersuchungen sollte dann die biologische Funktion der identifizierten Oberflächenproteine, sowie deren Rolle als Virulenzfaktoren aufgeklärt werden.

Auf der Oberfläche von Pneumokokken werden Proteine exprimiert, die aufgrund einer besonderen, cholinvermittelten Interaktion mit den Lipoteichonsäuren nicht-kovalent mit der Zellwand assoziiert sind. Für diese Interaktion sind die im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisierten Repeats verantwortlich. Von diesen sogenannten cholinbindenden Proteinen konnten bisher nur 3 (Autolysin, PspA und SpsA) von ungefähr 11 (Sheffield *et al.*, 1992) charakterisiert und in weiteren Untersuchungen als Virulenzfaktoren bestätigt werden.

Mit dieser Arbeit sollten weitere Proteine dieser Familie identifiziert und analysiert werden. Dazu wurden ein molekularbiologischer, sowie die Computer-unterstützte Genomanalyse im späteren Verlauf der Arbeit angewendet. Die Untersuchung auf der molekularen Ebene sollte mit einer DNA-Sonde erfolgen, deren Sequenz für die Repeats des SpsA-Proteins kodiert. Mit dieser Sonde sollte unter nicht-stringenten Bedingungen eine Expressionsphagenbank von *S. pneumoniae* auf homologe DNA-Sequenzen untersucht werden. Die biologische Funktion der identifizierten Nukleotidsequenzen sollte mit genetischen, biochemischen und immunologischen Methoden bestimmt werden. Die Computer-unterstützte Genomanalyse wurde nach Veröffentlichung der Genomsequenz eines Pneumokokkenstammes des Serotyps 4 möglich (Tettelin *et al.*, 2001). Hierzu sollte das translatierte Genom auf Homologien zur Repeatstruktur von SpsA untersucht, die identifizierten homologen Sequenzen aus verschiedenen Pneumokokkenstämmen amplifiziert und näher charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

siehe Anhang

3.2 Stammhaltung

Die Aufbewahrung der *E. coli*-Stämme erfolgte bis zu 6 Wochen bei 4°C auf LB-Agarplatten, gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotikum. Die Pneumokokken wurden bis maximal einer Woche auf Blutagarplatten bei Raumtemperatur gehalten. Die Transformanten von *S. pneumoniae* wurden auf Blutagarplatten mit Erythromycin maximal 2 Tage bei Raumtemperatur gehalten. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in Glycerol bei -85°C. Für die *E. coli*-Stämme wurde 50% Glycerol und für die Pneumokokken wurde aufgrund der Anfälligkeit hinsichtlich der Viabilität beim wiederholten Auftauen und Einfrieren 25% Glycerol verwendet. λ -Phagen wurden in Form von chloroformierten λ -Lysaten bei 4°C aufbewahrt.

3.3 Kulturbedingungen

Die Anzucht der Stämme erfolgte bei 37°C. Flüssigkulturen von *E. coli*-Stämmen wurden bei 120 rpm unter aeroben Bedingungen inkubiert, während die Anzucht der Pneumokokken unter mikroaerophilen Bedingungen, wenn erforderlich mit 5% CO₂ im CO₂-Brutschrank, erfolgte. Die Kultivierung der λ -Phagen wurde laut Maniatis *et al.*, 1992 durchgeführt.

3.4 Nährmedien

Todd Hewitt Broth (THB):	von Oxoid (36,4 g/l)
THY:	THB mit 0,5% Hefe-Extrakt
Luria-Broth-Medium (LB-Medium):	1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,5
LBMM:	1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 0,01 M MgCl ₂ , 0,4% Maltose, pH 7,5
SOB-Medium:	2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl,
	2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
Blutagar:	Kommerziell erworben von Fa. Merck und Becton-Dickinson

3.5 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Größe (kb)	Resistenz	Herkunft
pBluescript [®] -CMV:	4,52	Neo, Kan	Stratagene
pQE-30:	3,4	Amp	Qiagen
λ_{ZAP} -Express TM		Neo, Kan	Stratagene
pJDC9	6,95	Ery	Chen und Morrison, 1987
pJDC9:: <i>nanB</i>	7,3	Ery	Düsseldorf
pJDC9:: <i>pspA</i> (pMSH5)	7,35	Ery	Braunschweig
pQSH1	4,3	Amp	Hammerschmidt, <i>et al.</i> , 1997
pQSH2	4,1	Amp	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997
pQP1	4,5	Amp	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1999

Die Restriktionskarte von pJDC9 befindet sich im Anhang.

3.6 Bakteriophagen

‘ExAssist™ interference-resistant helper phage’ mit ca. 1.0×10^{10} pfu/ml von Stratagene®.
 λ_{ZAP} -Bakteriophage aus dem ‘Giga Pack® III Gold Packaging Kit’ von Stratagene®.

3.7 Antikörper und Plasmaproteine

DIG:

Anti-Digoxigenin F(ab)₂-Fragmente - Alkalische Phosphatase konjugiert Boehringer

IgA:

Humanes Serum IgA - Peroxidase konjugiert Dianova

Humanes Sekretorisches IgA, Colostrum ICN

Ziege-Anti-Human-IgA - Peroxidase konjugiert ICN

IgG:

Humanes IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ Calbiochem

Ziege-Anti-Human-IgG (γ -chain specific) - Peroxidase konjugiert Sigma

Fibronektin:

Humanes Plasma Fibronektin Calbiochem

Anti-Human-Fibronektin - Peroxidase konjugiert Dakopatts

Fibrinogen:

Humanes Fibrinogen, Plasminogen-frei Sigma

Kaninchen-Anti-Human-Fibrinogen - Peroxidase konjugiert DAKO

Lactoferrin:

Humanes Lactoferrin, eisenfrei Sigma, ICN

Humanes Lactoferrin, eisengesättigt Sigma

Kaninchen-Anti-Human-Lactoferrin F(ab')₂-Fragmente - Peroxidase konjugiert Dianova

Rinder-Lactoferrin, aus Milch Sigma

α_2 -Makroglobulin:

Humanes α_2 -Makroglobulin Sigma

Kaninchen-Anti-Human- α_2 -Makroglobulin Behring

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG - Peroxidase konjugiert DAKO

Transferrin:

humanes apo-Transferrin Sigma

Ziege-Anti-Human-Transferrin Sigma

Kaninchen-Anti-Ziege-IgG (whole molecule) - Peroxidase konjugiert Sigma

3.8 Enzyme

Lysozym: 5 mg/ml Lysozym in TES Sigma

Mutanolysin: 1 mg/ml Mutanolysin in TES

Sigma

Neuraminidase: 2,5 mU/ μ l Sigma

Polymerase (AmpliTaq): 5 U/ μ l Perkin-Elmer

Pronase E: 1 mg/ml in PBS Sigma

Proteinase K: 1 mg/ml in PBS Sigma

Restriktions-Endonukleasen: Erkennungssequenz: Firma:

*Bam*H I (20000U/ml) G/GATTC NEB

*Eco*RI (10000U/ml) G/AATTC NEB

*Hind*III (20000U/ml) A/AGCTT NEB

*Sau*3A (4000U/ml) /GATC NEB

RNase-Stock: 5 mg/ml RNase in PBS Boehringer

T4-DNA-Ligase 5 U/ml Boehringer

Trypsin: 1 mg/ml in PBS Serva

Trypsin-Inhibitor: 2,5 mg/ml in PBS Serva

3.9 Antibiotika

Ampicillin (Amp) 100 µg/ml und Kanamycin (Km) 25 µg/ml wurden für rekombinante *E. coli* verwendet. Erythromycin (Ery) 1-3 µg/ml wurde für *S. pneumoniae* verwendet.

3.10 Oligodesoxynukleotide (Primer)

Alle Primer wurden von GIBCO BRL bezogen (GIBCO BRL CUSTOM PRIMERS™).

pQE-30 Sequenzierprimer:

Die Primer befinden sich kurz vor bzw. hinter der 'multiple cloning site' von pQE-30 und wurden für die Amplifikation bzw. Sequenzierung der in pQE-30 klonierten Fragmente verwendet.

pQE-1 : 5' GAGCGGATAACAATTTACACAG 3' (5'-Primer)

pQE-2 : 5' GTTCTGAGGTCATTACTGGATC 3' (3'-Primer)

pQE-16: 5' CATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAG 3' (5'-Primer)

Primer für die Amplifikation bzw. Sequenzierung der ermittelten Sequenzen der Pneumokokkengenbank:

T₃-Primer: 5' AATTAACCTCACTAAAGGG 3' (5'-Primer)

T₇-Primer: 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3' (3'-Primer)

Alle weiteren Primer für die Sequenzierung wurden anhand der jeweils neu ermittelten Sequenzabschnitte, im sogenannten Primer-walking, entworfen.

Primer für die Konstruktion der Gensonden *pcpA*, *pspA*, *spsA*, *lytA* und *spsA*-Repeat-Sonde:

pcpA: PCPA1 nt 2064 - nt 2092

5' GCGCGCGCGCGGATCCAAAAAACTACAATATTATCATTAAC 3'

PCPA2 nt 3509 - nt 3528

5' GCTTAGTCCAAGTTACCGATTTCGAACCTCCTCCTC 3'

lytA: PRP1 nt 204 - nt 228

5' GCGCGCGCGCGGATCCGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAA 3'

PRP2 nt 707 - nt 728

5' CTCCTCCTCAAGCTTTGTTTCAATCGTCAAGCCGTT 3'

0*spsA*: SH22 nt 283 - nt 304

5' GCGCGCGCGCGGATCCTTGTGTCATCAAAAAGCGAAAG 3'

SH25 nt 1229 - nt 1253

5' CTCAGCTAATTAAGCTTTTTTGGAGTAGATGGTTGTGCTGG 3'

spsA-Repeat-Sonde:

SH23 nt 1830 - nt 1853

5' CTCAGCTAATTAAGCTTGTGTTAGTTTACCCATTACCATTTGGC 3'

SH24 nt 1254 - nt 1274

5' GCGCGCGCGCGCGGATCCACAGGCTGGAAACAAGAAAAC 3'

pJDC9:

pUC191 nt 434 - nt 450 (*lacZα*)

5' CGAGCTCGGTACCCGGG 3'

pspA: SH20 nt 127 - nt 153
 5' GCGCGCGCGCGGATCCTTGAATAAGAAAAAATGATTTTAACA 3'
 SH21 nt 1966 - nt 1986
 5' CTCAGCTAATTAAGCTTGCTTAAACCCATTCACCATTGGC 3'
 SH30 nt 1285 - nt 1304
 5' GCTTTTGGCGGTTGCTGTTG 3'
 SH34 nt 1307 - nt 1329
 5' CTCAGCTAATTAAGCTTTTTTGGTGCAGGAGCTGGTTTTTC 3'
 SH38 nt 214 - nt 240
 5' GCGCGCGCGCGCGGATCCGAAGAATCTCCCGTAGCCAGTC 3'
 PPR1 nt 214 - nt 237
 5' CTCCTCCTCGGATCCGAAGAATCTCCCGTAGCC 3'
 PPR2 nt 1059 - nt 1083
 5' GCGCGCGCGCAAGCTTATTAAGTCTTTCTTAAGGTC 3'
 PPR3 nt 421 - nt 438
 5' GCGCGCGCGCAAGCTTTGCTGCCACTGCCTTATC 3'
 PPR4 nt 439 - nt 458
 5' CTCCTCCTCGGATCCGTTCAACAAGCGTATCTAGC 3'
 PPR5 nt 701 - nt 720
 5' GCGCGCGCGCAAGCTTCACTTTTTGTTTGGCTTCAG 3'
 PPR6 nt 721 - nt 739
 5' CTCCTCCTCGGATCCGATGCTGAAGAAGTCGCTC 3'
 PPR7 nt 949 - nt 969
 5' GCGCGCGCGCAAGCTTAGCAGCTTTAAGTTGATCTTC 3'
 PPR8 nt 970 - nt 991
 5' CTCCTCCTCGGATCCGAAGAAAACAATAATGTAGAAG 3'
 SW2 nt 697 - nt 720
 5' AAGCTTCACTTTTTGTTTGGCTTCAGTAGC 3'

Primer für die Gen-Amplifikation des Proteins vom Genomabschnitt 4139:

4139-3 nt 76 - nt 100
 5' CACCACCACGGATCCCAAGAAAGTTCAGGAAATAAAATCC 3'
 4139-5 nt 984- nt 1008
 5' GCGCGCGCGCAAGCTTTTGAAAACCTTGGAATCGGCTTGTA 3'

3.11 Reaktionskits

Abi Sequencing Prism TM Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
Dig Oligonucleotide 3'-End Labeling and Detection Kit	Boehringer-Mannheim
Giga Pack [®] III Gold Packaging Kit	Stratagene
λ _{ZAP} Express TM predigested Cloning Kit	Stratagene
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Prime-It [®] Random Primer Labeling Kit	Stratagene
QIAprep Spin Plasmid Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN
Silver Stain Plus Kit	Bio-Rad

3.12 Puffer und Lösungen

Chloronaphthol:	20% (w/v) in Methanol
50 x Dehnhardt's:	1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidin in 6xSSC
EDDHA-Stammlösung:	0,2 M EDDHA (deferriert) in 1 M NaOH lösen, pH 9,0, steril filtrieren
KGB-Puffer (10x):	1 M Kaliumglutamat, 0,25 M Tris-Acetat, 0,1 M Magnesiumacetat, 5% (w/v) BSA, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,6, steril filtrieren
PBS:	0,1 M Natriumphosphatpuffer, 0,1 M NaCl
PBST:	PBS mit 0,05% Tween20
Semi-Dry-Blotting Puffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol
SM-Puffer:	0,1 M NaCl, 16,6 mM $MgSO_4$, 5% 1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% Gelatine
T4-Ligasepuffer:	50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol
50 x TAE:	2 M Tris-Base, 0,6 M EDTA, 0,57% Eisessig
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5, 1 mM ATP, pH 7,6
<u>DIG-Nachweis mit CSPD:</u>	
Puffer 1:	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5
Waschpuffer:	Puffer 1 mit 0,3% Tween20
Puffer 2:	1% Blockierungsreagenz in Puffer 1
Puffer 3 (Detektionspuffer):	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5
<u>Isolierung chromosomaler DNA:</u>	
N-Laurylsarcosyl:	10% N-Laurylsarcosyl in 250 mM EDTA
TES:	50 mM Tris, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8.0
Sucroslösung:	20% Sucrose in TES
Lysozymbelösung:	5 mg/ml Lysozym in TES
Mutanolysinlösung:	1 mg/ml Mutanolysin in TES (frisch ansetzen)
RNase-Stock:	5 mg/ml RNase in TES (vor erstem Gebrauch 15 min / 100°C)
Pronaselösung:	5 mg/ml Pronase in TES (frisch ansetzen, vor Gebrauch 30 min / 37°C vorinkubieren)
<u>Plasmidisolierung (Mini-Prep):</u>	
Lösung 1:	50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA
Lösung 2:	0,2 M NaOH, 1% SDS (frisch ansetzen)
Lösung3:	7,5 M Ammoniumacetat (pH 7,4)

Plasmidisolierung (Midi-Prep):

Puffer P1:	100 µg/ml RNaseA, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)
Puffer P2:	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3:	3 M Kaliumacetat
Puffer QBT:	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol z.A., 0,15% Triton X-100, pH 7.0
Puffer QC:	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol z.A., pH 7.0
Puffer QF:	1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, pH 8.5
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

DNA-Aufreinigung:

Phenol/Chloroform:	50% Phenol, 50% Chloroform
--------------------	----------------------------

Elektrophoresepuffer und Lösungen für DNA und Proteine:

TAE-Puffer:	400 mM Tris-HCl, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,8
DNA-Probenpuffer (10x):	50% Glycerol in TA-Puffer, 1 mg Bromphenolblau
Protein-Probenpuffer:	60 mM Tris-HCl, 10% Glycerol, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau, pH 6,8
Probenpuffer (native):	60 mM Tris-HCl, 10% Glycerol, 0,01% Bromphenolblau, pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (8x):	125 mM Tris-HCl, 1 M Glycin, 0,5% SDS, pH 8,8
Semi-Dry-Blottingpuffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Acrylamidstock:	35% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
SDS-Stock:	10% SDS
Ammoniumpersulfat:	10% APS
Coomassie-Färbung:	0,1% Coomassieblau, 40% Methanol, 10% Eisessig
Entfärber:	40% Methanol, 10% Eisessig

Kolonieblot:

Lösung 1:	10% SDS
Lösung 2:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Lösung 3:	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris (pH 8,0)
Lösung 4:	5 x SSC, 0,5% SDS, 1 mM EDTA

Southern-Blot:

Denaturierungspuffer:	500 mM NaOH, 1,5 NaCl
Neutralisierungspuffer:	1 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5
20 x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0
High-SDS- :	7% SDS, 50% deionisiertes Formamid, 5 x SSC,
Hybridisierungspuffer	50mM Na-PO ₃ , pH 7,0, 0,1% N-Laurylsacsin, 2,0% Blockierungsreagenz (Boehringer)
Waschpuffer:	0,1M Maleinsäure, 0,15M NaCl, 0,3% TWEEN 20, pH 7,5
Blockingpuffer :	1% Blockierungsreagenz in 0,1M Maleinsäure
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5

‘Strippen’ von Nylonmembran:

Moderate – ‘stripping’-Lsg.:	0,2 M NaOH, 0,1% SDS
------------------------------	----------------------

SPOT-Synthese:

TBS:	0,8% (w/w) NaCl, 0,02% (w/w) KCl, 50 mM Tris-base, pH 7,0
T-TBS:	TBS + 0,05% Tween20
Blockingpuffer:	Blocking-Reagenz ('Casein based blocking buffer' von Genosys, 10x) 1:5 verdünnt in T-TBS, 5% (w/w) Saccharose

Filmentwicklung:

Entwickler-Lösung:	Ilford Multigrade Papierentwickler (1:10 verdünnt)
Stop-Lösung :	Ilford IN-1
Fixierer-Lösung:	Ilford Papier-Fixierer

Aufreinigung von His-tag-Fusionsproteinen:a) unter native Bedingungen:

Puffer 1 (Lysepuffer):	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Puffer 2 (Waschpuffer):	siehe Puffer 1, mit 20 mM Imidazol
Puffer 3 (Elutionspuffer):	siehe Puffer 1, mit 250 mM Imidazol

b) unter denaturierende Bedingungen:

Puffer 1 (Lysepuffer):	8 M Urea, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,01 Tris-HCl, pH 8,0
Puffer 2 (Waschpuffer):	siehe Puffer 1, pH 6,3
Puffer 3 (Elutionspuffer):	siehe Puffer 1, pH 4,5

3.13 Methoden für das Arbeiten mit DNA**3.13.1 Agarosegelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten dienten Agarosegele verschiedener Konzentrationen (0,6% bis 1,2%). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag 10:1 mit DNA-Probenpuffer gemischt, wobei das enthaltene Bromphenolblau als optischer Marker diente. Als DNA-Größenstandard diente *Hind*III geschnittene λ -DNA und der '1 kb-Ladder'-Marker von GibcoBRL. Das Anfärben der DNA erfolgte mit einer Ethidiumbromidlösung (1 μ g/ml) und die DNA-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht (302nm) visualisiert und mit einem Videodokumentationssystem (Herolab) dokumentiert werden. Falls eine Aufreinigung aus dem Gel erfolgte, wurde das entsprechende DNA-Fragment ebenfalls unter UV-Licht ausgeschnitten und weiterbehandelt.

3.13.2 Aufreinigung von DNA

Die präparative Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem 'QIAquick Gel Extraction Kit' von QIAGEN. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem 'PCR Purification Kit' von QIAGEN, jeweils nach den Angaben des Herstellers.

3.13.3 Phenolisierung und Fällung von DNA

Diese Methode diente dazu, die DNA nach Restriktions- und PCR-Ansätzen aufzureinigen, so daß die vorher im Reaktionsansatz enthaltenen Enzyme, Primer, Nukleotide und Salze keinen störenden Einfluß auf eine weitere Prozessierung der DNA, z.B. Ligation oder Digoxigenin-Markierung, ausüben konnten. Hierzu wurde das Probenvolumen mit ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt und mit 100 μ l Phenol vermischt. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 3 Minuten bei 14500 x g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde abgenommen und mit 100 μ l Phenol/Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Fällern der DNA mit 1/10 Volumeneinheiten (VE) 3 M Natriumacetat und 2,5 VE eiskaltem 98% Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht oder bei -85°C für 30 Minuten. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 14500 x g zentrifugiert und mit

70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA bei 37°C wurde diese in TE-Puffer oder ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.13.4 Phenolisierung und Etherisierung von DNA

Dieses Verfahren diente dazu, die Salze aus dem Ligationsansatz zu entfernen, da es ansonsten bei einer sich anschließenden Elektroporation von DNA in Bakterienzellen zu einem Kurzschluß kommen könnte. Der Ligationsansatz wurde hierfür mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, mit 250 µl Phenol/Chloroform versetzt, gemischt und für 3 Minuten bei 14500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und die restliche Phenolphase mit 100 µl ddH₂O extrahiert. Der wäßrige Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint und mit 200 µl Diethylether versetzt, gemischt und für 1 Minute zentrifugiert. Die obere Etherphase mit den extrahierten Phenolresten wurde verworfen und eine zweite Etherextraktion erfolgte. Die wäßrige Phase wurde danach für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieses diente zur Verflüchtigung von Etherrückständen. Danach erfolgte die Fällung der DNA und Resuspension in 10 µl ddH₂O.

3.13.5 Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien

Dieses Verfahren diente zur Präparation größerer Mengen chromosomaler DNA aus *E. coli* und *S. pneumoniae*. Hierzu wurden 200 ml einer frischen Übernachtskultur (*E. coli*) bzw. einer Kultur mit OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 (*S. pneumoniae*) für 15 Minuten bei 8500 x g (GSA-Rotor) bei 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 6 ml TES resuspendiert und zur Lyse der Bakterien mit 1 ml Lysozym (5 mg/ml) und 100 µl Mutanolysin (1 mg/ml Tris, pH 7,5) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C. Nach Zugabe von 100 µl RNase (5 mg/ml TES) erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Probe mit 500 µl Pronase E (5 mg/ml TES; Vorinkubation für 30 Minuten bei 37°C) versetzt und erneut für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl N-Laurylsarcosyllösung und einstündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Fällung der Proteine mit Phenol und Phenol/Chloroform. Hierzu wurde die Lösung mit 2 ml Phenol gemischt und bei 10000 x g (SS34-Rotor) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird danach mit 2 ml Phenol/Chloroform extrahiert. Dieses erfolgte solange, bis in der Interphase keine gefällten Proteine mehr zu erkennen waren. Danach erfolgte die Fällung der DNA mit 1/10 VE Natriumacetat und 1 VE Isopropanol bei 10000 x g für 10 Minuten bei 4°C. Nach Waschen mit 70% eiskaltem Ethanol, wurde das Sediment bei 37°C getrocknet, in 200 µl ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.13.6 Schnellmethode zur Plasmidisolierung aus *E. coli* (Birnboim und Doly, 1979)

5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für die Plasmid-tragenden Bakterien wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde für 3 Minuten bei 7000 x g zentrifugiert und die Bakterien in 200 µl Plasmidpräparationslösung 1 resuspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl frisch angesetzter Lösung 2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung und eine weitere 5 minütige Inkubation auf Eis. Zur Abtrennung der Membranen, chromosomaler DNA und Proteine wurde für 10 Minuten bei 14500 x g zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 750 µl des Überstandes mit 750 µl Isopropanol versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die DNA mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, in 50 µl ddH₂O mit RNase (5 µg/ml) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.13.7 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid-DNA Isolierungskit nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde dabei nach einer alkalischen Lyse der Bakterien über eine Ionenaustauschersäule aufgereinigt. Das Eluat wurde zum Fällern der DNA mit Isopropanol versetzt, zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, und nach dem Trocknen der DNA bei 37°C in 500 µl TE-Puffer bzw. ddH₂O resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte wie unter 3.14.9 beschrieben.

3.13.8 Plasmidpräparation aus *E. coli* für die Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde besonders reine Plasmid-DNA benötigt, so daß eine Präparation von Plasmiden mit dem 'QIAprep Spin Plasmid Kit' nach Angaben des Herstellers erfolgte.

3.13.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 260nm in 1 ml Quarzglasküvetten. Es wurden 5 µl DNA in 1 ml ddH₂O gemessen. Bei einer OD₂₆₀ von 1 ergibt sich hierbei eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ zeigte die Reinheit der Präparation an. Bei sauberer Präparation sollte das Verhältnis 1,8 bis 2,0 betragen. Bei Werten, die darunter lagen, mußte eine Verunreinigung durch Proteine und/oder Phenol und bei Werten über 2,0 von der Anwesenheit von RNA oder denaturierter DNA angenommen werden.

3.13.10 Markierung von DNA-Sonden

3.13.10.1 Markierung spezifischer DNA-Sonden mit Digoxigenin

Bei dieser Methode handelte es sich um eine nicht-radioaktive Markierung von aufgereinigter und linearisierter DNA. Hierzu wurde der 'DNA Labeling and Detection Kit' von Boehringer laut Angaben des Herstellers verwendet. Die Markierung der denaturierten DNA erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP in einer mit der Klenow-DNA-Polymerase durchgeführten Reaktion. Für die Polymerase diente ein Gemisch verschiedener Hexanukleotide als 'Random'-Primer. Die so markierte DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Sonde konnte bis zu 4 - 6 Mal wiederverwendet werden.

3.13.10.2 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden mit ³²P-dCTP

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit dem 'Prime-It[®] Random Primer Labeling' System von Stratagene. Die Methode beruhte auf der zufälligen Anlagerung von Hexanukleotiden an die DNA, der Synthese eines neuen DNA-Stranges mittels der Klenow-Polymerase und den Einbau von [α -³²P]dCTP anstelle von dCTP. Die Markierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide erfolgte mit dem 'QIAquick Nucleotide Removal Kit' von QIAGEN nach den Herstellerangaben.

3.13.11 Southern-Blot (Southern, 1975) und DNA-Hybridisierung

Für den Southern-Blot wurde die DNA zunächst mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, elektrophoretisch in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert. Danach erfolgte eine Inkubation für je 15 Minuten in 0,25 M HCl, bei der die DNA zerkleinert wurde, und dann zur Denaturierung in 0,4 M NaOH. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (QIAGEN) erfolgte durch den Gravitations-unterstützten alkalischen Transfer mit 0,4 M NaOH für 2,5 Stunden. Die Membran wurde danach mit 2 x SSC für jeweils 10 Minuten gewaschen und bei RT getrocknet. Die Vernetzung der DNA mit

der Membran erfolgte bei 1200 mJoule im UV-Stratalinker® 1800 von Stratagene und beim Backen der Membran für 20 Minuten bei 120°C. Eine Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit der Hybridisierungslösung mit 'Blocking Reagenz'. Die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen erfolgte mit der Digoxigenin-markierten und denaturierten DNA-Sonde über Nacht bei 68°C bzw. 42°C bei Verwendung des High-SDS-Hybridisierungspuffers. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 10 Minuten bei RT mit 2x SSC, 0,1% SDS und zweimal für 15 Minuten bei 68°C bzw. 42°C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Detektion der DNA erfolgte mit der Chemilumineszenz-Methode mit CSPD® als Substrat von Boehringer. Die Detektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Es erfolgte eine Röntgenfilm-Exposition der Membran für 20 Minuten bis 2 Stunden.

3.13.11.1 Hybridisierung mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Dieses Verfahren wurde bei der Untersuchung der Genbank von *S. pneumoniae* verwendet. Hierbei wurde zunächst die Nylonmembran, die nach einem Plaquelift erhalten wurde, für 1-2 Stunden in Hybridisierungslösung inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der radioaktiv-markierten DNA-Sonde, nachdem diese mit Heringssperm-DNA versetzt und für 5 Minuten bei 100°C denaturiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C bzw. 46°C, je nachdem, ob stringente oder nicht-stringente Hybridisierungsbedingungen gewählt wurden. Je nach den Bedingungen schloß sich ein anderes Waschprotokoll an. Für stringente Bedingungen wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC mit 0,1% SDS für jeweils 5 Minuten bei RT, zweimal mit 0,2 x SSC mit 0,1% SDS für jeweils 5 Minuten bei RT und einmal mit 0,2 x SSC mit 0,1% SDS für 15 Minuten bei 42°C gewaschen. Bei nicht-stringenten Bedingungen wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC mit 0,1% SDS für je 15 Minuten bei RT gewaschen. Es folgte eine autoradiographische Exposition der Membranen für 5 Stunden.

3.13.11.2 Entfernung einer radioaktiven DNA-Sonde von hybridisierten Nylonmembranen

Bei diesem Verfahren ('stripping') wurden die radioaktiv-markierten DNA-Sonden mit einem speziellen Puffer von der Membran gewaschen. Hierzu wurde die Membran zunächst in 0,2 M NaOH mit 0,1% SDS für zweimal 15 Minuten bei 37°C gewaschen. Eine Kontrolle des Waschergebnisses erfolgte durch die Scintillationsmessung der Membran. Danach wurde die Membran mit 2 x SSC gespült und autoradiographisch exponiert, um die Hintergrundaktivität des Filters zu bestimmen.

3.13.12 Klonierung von DNA

3.13.12.1 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die die DNA an spezifischen Stellen schneiden. Durch die anschließende Auftrennung der Restriktionsansätze in einer Agarosegelelektrophorese konnten die Größen der entstehenden Fragmente anhand des Vergleichs mit Längenstandards ermittelt werden. Für die Restriktionsansätze wurden 5 U Enzym eingesetzt, um 1 µg DNA in einer Stunde zu spalten. Die Inkubation erfolgte in einem 15 µl Ansatz bei 37°C. Chromosomale DNA wurde mit 15 - 20 U Enzym pro µg DNA gespalten. Als Puffer für die Restriktion wurde der unter Punkt 12 beschriebene KGB-Puffer eingesetzt. Die von jedem Enzym benötigte Konzentration konnte nach der von McClelland *et al.* (1988) ermittelten Tabelle abgelesen werden.

3.13.12.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die Ligase verband, in Gegenwart von ATP, lineare doppelsträngige DNA-Fragmente durch die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH Ende und dem 5'-Phosphat Ende beider Stränge. Die Ligation erfolgte in 1 x Ligase-Puffer über Nacht bei 14°C in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligationspartner wurden dazu im äquimolaren Verhältnis gemischt (Sambrook *et al.*, 1989).

3.13.13 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation (Böttger, 1988)

Für die Elektroporation mußte die Konzentration von geladenen Molekülen bzw. die Salzkonzentration im der Bakterien enthaltenen Suspension möglichst gering sein. Dieses wurde mit mehreren Waschschritten erreicht. Zunächst wurden 1 l LB-Medium mit einer 5 ml über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden danach für 15 Minuten bei 3000 x g bei 4°C zentrifugiert, zweimal mit eiskaltem ddH₂O und anschließend mit 10%igem eiskaltem Glycerin gewaschen. Die kompetenten Zellen wurden in 2,5 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 40 µl bei -80°C gelagert.

3.13.14 Transformation von DNA in Bakterienzellen

3.13.14.1 Transformation in *E. coli* durch Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine Transformationsart, bei der sich durch die angelegte Spannung kurzzeitig Poren in der Bakterienzellwand öffnen. Hierdurch können die DNA-Moleküle aufgenommen werden. 40µl der kompetenten Bakterienzellen wurden in eine auf Eis vorgekühlte 2 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad) pipettiert und elektro-poriert. Die physikalischen Parameter für die Elektroporation waren 25 kV, 200 Ω und 25 µF (Gerät: Gene Pulser/ Gene Controller-System von Bio-Rad, Richmond, USA). Die Bakterien wurden sofort in 1 ml LB-Medium überführt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Elektroporationsansatz wurde in geeigneten Aliquots auf LB-Agarplatten mit für das Plasmid selektivem Antibiotikum bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.13.14.2 Transformation von DNA in *S. pneumoniae* (Yother, 1986)

Die Transformation von *S. pneumoniae* R6 mit dem Plasmid pMSH5 diente der Herstellung einer stabilen Mutante mit einer Deletion im *pspA*-Gen. Für die Transformation von *S. pneumoniae* wurde die natürliche Kompetenz von Pneumokokken ausgenutzt, die zum ersten Mal von Avery *et al.* (1931) beschrieben wurde. Zur Induktion der Kompetenz wurde ein Polypeptid, das Competence Stimulating Peptide 1 (CSP1), benötigt. Dieses Pheromon ist Bestandteil eines Bakteriendichte-abhängigen Signaltransduktionsprozesses, deren weitere beteiligte Faktoren noch nicht aufgeklärt sind.

Der Pneumokokkenstamm wurde über Nacht auf einer Blutagarplatte inkubiert und in THY-Medium bei einer OD₆₀₀ von 0,020 bis 0,030 inokuliert. Für den Stamm wurde ein Kompetenzprofil mit dem Konstrukt pJDC9::*nanB* erstellt und die OD₆₀₀ maximaler Kompetenz ermittelt. Hierzu wurden der Kultur in 0,02 OD₆₀₀-Schritten 1,5 mL Kultur entnommen und es erfolgte die Zugabe von 1,5 µl CSP1-Stocklösung (10 µg/ml). Nach Inkubation bei 37°C für 20 Minuten wurde der Ansatz für 4 Minuten auf Eis gestellt. Ein 250 µl-Aliquot wurde zu 1 µg Plasmid-DNA (pJDC9::*nanB*) gegeben und dieser Transformationsansatz wurde für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Zugabe von DNase I (Endkonzentration 10 µg/ml) erfolgte eine Inkubation von 90 Minuten bei 37°C, um nicht-transformierte DNA zu zerstören. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf eine Blutagarplatte mit 1 µl/ml Erythromycin und 4 ml THY-Agar ausplattiert und für 1-2 Tage im

CO₂-Inkubator kultiviert. Die OD₆₀₀ maximaler Kompetenz lag für diesen Stamm bei 0,12. Zur Transformation von R6 mit pMSH5 wurde eine erneute Kultur bei OD₆₀₀ = 0,12 mit pMSH5 versetzt und entsprechend dem Protokoll fortgeführt. Wachsende Transformanden wurden auf Blutagarplatten mit 5 µl/ml Erythromycin überimpft. Als Positivkontrolle diente das Plasmid pJDC9::*nanB*.

3.13.15 DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Zur Sequenzierung wurde die Methode der 'Taq Cycle'-Sequenzierung mit 'Dye Deoxy'-Terminatoren benutzt. Dieser nicht-radioaktiven Sequenziermethode lag das Kettenabbruchverfahren nach Sanger zu Grunde, bei der einzelsträngige DNA als Matrice für eine Taq-DNA-Polymerase diente. Diese katalysierte in einer *in vitro*-Polymerisierungsreaktion die Synthese des komplementären DNA-Strangs vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende im Rahmen einer PCR-Reaktion. Hierbei wurden die markierten Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) eingebaut, die zum Abbruch der Kettenverlängerung führten. Dabei entstanden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die elektrophoretisch in hochauflösenden Sequenziergelen aufgetrennt werden konnten. Durch Laserdetektion der ddNTP und Digitalisierung der Daten konnte die Abfolge der Basen bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte an einem 'Applied Biosystems' Sequenzierautomaten (373 A DNA Sequenzer). Der 20 µl Reaktionsansatz setzte sich aus 0,5 - 1 µg DNA, 4 µl Premix, 5 pmol Primer und ddH₂O zusammen, der mit 10 µl Mineralöl überschichtet wurde. Der PCR-Zyklus erfolgte für 25 Runden und war wie folgt aufgebaut: Denaturierung bei 96°C für 15 Sekunden, Annealing bei einer Temperatur, der der Schmelztemperatur des Primers entspricht minus 5°C, für 15 Sekunden und Extension bei 60°C für 4 Minuten. Vor der anschließenden Auftrennung im Gel wurde die DNA durch Fällung mit Ethanol und 3 M NaAc (pH 4,6) aufgereinigt und in 3 µl Probenpuffer (Formamid:EDTA = 4:1) resuspendiert. (Die Anfertigung der Sequenziergele und die Auftrennung der Proben erfolgte als Serviceleistung in der GBF-Arbeitsgruppe von Dr. E. Moore).

3.13.15.1 Auswertung der Sequenzierdaten

Je nach gewähltem Primer wurde die Sequenz des kodierenden (5'-3'-Richtung) oder nichtkodierenden DNA-Stranges (3'-5'-Richtung) erhalten. Die Auswertung der Basenabfolge erfolgte mit der im Internet zur Verfügung gestellten Programme und der Software (DNASTar). Dieses diente zur Identifizierung von offenen Leserastern, Erstellung von Restriktionskarten, Übersetzung der Nukleinsäureabfolge in die entsprechende primäre Aminosäuresequenz und Sequenzvergleiche mit vorhandenen Datenbanken (FASTA und BLAST). Zu den Internet-anwendungen zählten die vielfältigen Sequenz-Browser vom 'National Center for Biotechnology' (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), vom 'Swiss Institute of Bioinformatics' (SIB; <http://www.sib.ch>) und vom 'European Bioinformatics Institute' (EBI; <http://www.ebi.ac.uk>). Eine umfangreiche Übersicht über diverse Sequenzanalyse-Programme ist ebenfalls unter der Internetseite 'Pedros BioMolecular Research - Part 1: Molecular Biology Search and Analysis' (http://www.fmi.ch/biology/rt_1.html) zu finden. Ein Vergleich mit den bisher veröffentlichten Daten der Genomsequenzierung von *S. pneumoniae* erfolgte mit dem BLAST-Programm für nicht-fertiggestellte Genomsequenzen des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/unfinishedgenome.html>).

3.13.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki *et al.*, 1988)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten von einer bekannten 'Template'-DNA. Die Methode basiert auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase, eine DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang aufzupolymerisieren, sofern ihr ein Stück Doppelstrang-DNA am Anfang zur Verfügung steht. Diese kurzen

Doppelstrang DNA-Stücke wurden durch Oligonukleotide (Primer), die antiparallel zueinander auf den beiden Strängen der DNA hybridisierten, erhalten. Der zwischen ihnen liegende DNA-Abschnitt wurde dann in einem PCR-Thermocycler (Hybaid) amplifiziert. Hierbei erfolgte eine Denaturierung der DNA bei 94°C für 1 Minute, eine Hybridisierung (Annealing) der Primer für 1 Minute bei einer Temperatur, die 5-6°C unter der berechneten Schmelztemperatur der Primer lag, und die Polymerase-Reaktion (Extension) bei 72°C für eine Zeitspanne, die sich nach der Fragmentlänge der zu amplifizierenden DNA richtete - Richtwert war 30 Sekunden pro 500 bp. Dieser Zyklus erfolgte 36 mal mit einer Vorabdenaturierung von 4 Minuten bei 94°C und einer Abschlußextension bei 72°C für 6 Minuten. Die Größe der Oligonukleotide lag zwischen 25 und 30 Nukleotiden, mit Schmelztemperaturen zwischen 60 bis 70°C. Beim Design der Primer wurde darauf geachtet, daß diese bei Einführung von Schnittstellen eine spätere 'in frame'-Klonierung des Produktes ermöglichen, sowie einen möglichst hohen GC-Anteil am 3'-Ende des Primers aufwiesen. So wurde eine Doppelstrang-Struktur am Ende des Primers (Anfang der Polymerasereaktion) verstärkt. Jeder PCR-Ansatz wurde im 100 µl Reaktionsvolumen durchgeführt und enthielt als Template-DNA entweder 200 - 300 ng chromosomale DNA oder 10 ng Plasmid-DNA. Weiterhin enthielt der Ansatz 20 pmol der beiden Primer, je 0,25 mM der vier Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), den vom Hersteller mitgelieferten 10 x Reaktionspuffer in einer Verdünnung von 1:10 und ddH₂O. Die Zugabe von 2,5 U Taq-Polymerase erfolgte 5 Sekunden vor Beginn des ersten Annealings ('hot start'). Der Reaktionsansatz wurde zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet. Nach Ablauf der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes mittels Agarosegel-elektrophorese hinsichtlich erhaltener Amplifikate getestet. Da die Taq-Polymerase bei 30 durchgeführten Zyklen eine Fehlerrate von 0,25% (Saiki *et al.*, 1988) aufweist, war es notwendig, die erhaltenen Produkte bzw. die späteren rekombinanten Klone zu sequenzieren.

3.14 Proteinchemische Methoden

3.14.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Maniatis, 1987)

Eine Methode für die schnelle Abschätzung von Proteinkonzentrationen war die photometrische Messung bei 280nm und 260nm. Für die Berechnung der Massenkonzentration wurde folgende Formel verwendet: $(1,55 \times A_{280\text{nm}}) - (0,76 \times A_{260\text{nm}})$.

3.14.2 Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Herstellung von Bakterienlysaten wurden Bakterienkulturen bei einer OD von 600nm vermessen, zentrifugiert, vom Überstand befreit und in Proteinprobenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 100°C für 5 Minuten lysiert. Für die Elektrophorese wurden 5 - 20 µl der Lysate eingesetzt.

3.14.3 Auftrennung von Proteinen in diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihren Molekulargewichten wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld ist allgemein abhängig von ihrer Größe und ihrer Gesamtladung. Um den Effekt der Gesamtladung auszuschließen, wurden die Proteine mit dem negativ-geladenen Natrium-dodecylsulfat (SDS) versetzt. Durch die Anlagerung von SDS an die hydrophoben Regionen eines Proteins und durch die Reduktion der Disulfidbrücken an Sulfhydrylgruppen dissoziieren diese in ihre Untereinheiten und eine alles überdeckende negative Ladung umgibt

die denaturierten Proteine. Die Proteine wandern während der Elektrophorese zur Anode und es kommt somit zu einer Auftrennung nur nach Molekülgröße. Als Größenstandards dienten vorgefärbte Proteinmarker (Sigma). Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte die Probenkonzentrierung in einem niederprozentigen Sammelgel und die Auftrennung der Proteine in einem höherprozentigen Trenngel. Die Konzentration des Trenngels richtete sich nach der Größe der zu trennenden Proteine. Als Stammlösung diente eine 30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisierung erfolgte durch die Zugabe von 0,5% Ammoniumpersulfat und 0,1% TEMED. Das Trenngel (10-16% in 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS) wurde mit einem 4%igen Sammelgel in 0,12 M Tris-HCl, pH 6,8 und 0,1% SDS überschichtet. Durchgeführt wurden die Elektrophoresen mit der 'MINI-PROTEAN-II'-Aparatur der Firma Bio-Rad.

3.14.4 Native Auftrennung von Proteinen in diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Diese Methode diente dazu, Proteine und ihre Bindungsaktivität in ihrer nativen Struktur nachweisen zu können, da Bindungseigenschaften unter denaturierenden Bedingungen verloren gehen können. Das Verfahren unterscheidet sich zu dem SDS-PAGE nur, indem in den verwendeten Lösungen (Gel, Puffer, Probenpuffer) kein SDS und kein β -Mercaptoethanol verwendet wurden.

3.14.5 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbung mit 'Coomassie Brilliant Blue' ist eine Methode, um Proteine in Acrylamidgelen sichtbar zu machen. Hierbei wird das Gel sofort nach der Elektrophorese für 1 Stunde in der Färbelösung gefärbt und dann in Entfärber inkubiert, bis der Farbstoff aus dem Gel gewaschen ist. Die Proteine behalten dabei ihre Färbung. Durch das Methanol-Eisessig-Gemisch wurden die Proteine gleichzeitig im Gel fixiert. Die Gele konnten so in Wasser aufbewahrt werden, bis sie im Gel Trockner getrocknet wurden.

3.14.6 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse beruhte auf dem Prinzip der Diffusion durch semipermeable Membranen. Je nach Molekulargewicht der Proteinlösung wurde diese in einem Dialyseschlauch (Servapor) passender Porengröße pipettiert und in dem gewünschten Puffer unter Rühren bei 4°C über Nacht dialysiert.

3.14.7 Enzymatische Untersuchungen

3.14.7.1 Enzymatischer Verdau der Pneumokokkenproteine mit Pronase E / Proteinase K

Eine Kultur von *S. pneumoniae* in THY mit einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 wurde für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (PB) resuspendiert, so daß eine Transmission von 10% erhalten wurde. 1 ml dieser Suspension wurde mit 100 µl Pronase E bzw. Proteinase K (je 1 mg/ml in PB) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl 250 mM PMSF abgestoppt und die Bakterien mehrfach mit PB gewaschen.

3.14.7.2 Enzymatischer Verdau der Pneumokokkenproteine mit Trypsin

Eine Kultur von *S. pneumoniae* in THY mit einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 wurde für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (PB) resuspendiert, so daß eine Transmission von 10% erhalten wurde. 1 ml dieser Suspension wurde mit 100 µl Trypsin (1 mg/ml in PB) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Trypsin-Inhibitor (2,5 mg/ml in PB) und 5 minütige Inkubation bei RT gestoppt.

Anschließend wurde das Verhalten der Bakterien gegenüber immobilisiertem Lactoferrin im 'solid phase protease assay' getestet.

3.14.7.3 Enzymatischer Verdau der Pneumokokkenpolysaccharide mit Neuraminidase

Eine Kultur von *S. pneumoniae* in THY mit einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 wurde für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (PB) resuspendiert, so daß eine Transmission von 10% erhalten wurde. 1 ml dieser Suspension wurde mit 40 µl Neuraminidase (0,1 U) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Verhalten der Bakterien gegenüber immobilisiertem Lactoferrin im 'solid phase protease assay' getestet.

3.14.8 Methoden für das Arbeiten mit iodierten Proteinen

3.14.8.1 Markierung von Proteinen mit ¹²⁵Iod (Hunter und Greenwood, 1962)

Die Iodierung diente zur radioaktiven Markierung von Proteinen, die den Einsatz der Proteine für qualitative und quantitative Tests erlaubte. Der Vorteil dieser Chloramin-T-Methode lag in der höheren Sensitivität. Es wurden 100 µg des Proteins (1 mg/ml in 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5) mit 500 µCi ¹²⁵Iod in mit Silikon-Sigmacote® behandelten Röhrchen gemischt. Nach Zusatz von 20 µl Chloramin-T (1 mg/ml in PB, frisch angesetzt) erfolgte eine Inkubation von einer Minute bei RT. Nach der Zugabe von 20 µl Na-Metabisulfit (1 mg/ml in PB, frisch angesetzt) wurde der Ansatz mit PBST auf 2,5 ml aufgefüllt. Es wurde 1 µl zur Bestimmung der Bindungseffizienz entnommen. Die Abtrennung des freien ¹²⁵I erfolgte über eine mit 25 ml PBST äquilibrierte PD 10 Gelfiltrationssäule. Das iodierte Protein wurde mit 3,5 ml PBST eluiert.

3.14.8.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität (TCA-Fällung)

Diese Methode diente zur Bestimmung der Effektivität der Proteinmarkierung. Der Einbau von ¹²⁵I in '%' entspricht dem Quotienten der gemessenen Aktivität nach der Präzipitation und der gemessenen Aktivität vor der Präzipitation, multipliziert mit dem Faktor 100. Hierzu wurde der vor der Aufreinigung über die PD 10-Säule entnommene Anteil von 1 µl mit 20 µl FCS versetzt und die Aktivität im Gammastrahlen-Zählgerät gemessen. Danach wurde das markierte Protein mit 10% TCA präzipitiert und die Aktivität wurde erneut bestimmt. Da die Radioaktivität mit der Zeit abnahm, wurde vor jedem Versuch erneut die Aktivität einer 10 µl-Probe nach Fällung mit FCS und TCA bestimmt.

3.14.8.3 Bindungsversuche mit ¹²⁵I-markierten Proteinen

Aufgrund der Polysaccharidkapsel war das Zentrifugieren von Pneumokokken teilweise erschwert - es bildete sich ein schleimiges Sediment. Daher mußten für die Bindungsversuche von ¹²⁵I-markiertem Lactoferrin zunächst eine andere Bakterienart bestimmt werden, die sich leicht zentrifugieren ließ und keine Bindung von Lf aufwies. Durch die Zugabe dieses Stammes konnten dann ebenfalls die Pneumokokken in ein festes Sediment überführt werden. Es wurden mehrere Stämme von Gruppe B Streptokokken und verschiedene Staphylokokken im radioaktiven Bindungsversuch mit ¹²⁵I-hLf getestet. Eine Kultur der Bakterien in THY mit einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 wurde bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, zweimal mit PBST gewaschen und auf eine Transmission von 10% in PBST eingestellt. Von dieser Bakteriensuspension wurden 250 µl mit 23 nCi - 37 nCi / 25 µl ¹²⁵I-markiertes Protein (50000 cpm - 80000 cpm) vermischt und für 45 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Zentrifugation des Ansatzes für 10 Minuten bei 14500 x g. Der Überstand wurde abgenommen und die Aktivität des Bakteriensediments bestimmt. Als Vergleich wurde der '100%' -Wert bestimmt, der der Aktivität von 25 µl des auf den gewünschten Wert

eingestellten Lactoferrins darstellte. Der prozentuale Anteil der Bindung ergab sich aus dem Quotienten der Aktivität der Bakterien und dem '100%-Wert'. Für den Stamm *Staphylococcus warneri* wurde der mit 2% geringste Wert an Bindung von hLf beobachtet, so daß dieser zum Abzentrifugieren von Pneumokokken verwendet wurde. Werte unter 5% wurden als Hintergrundaktivität betrachtet.

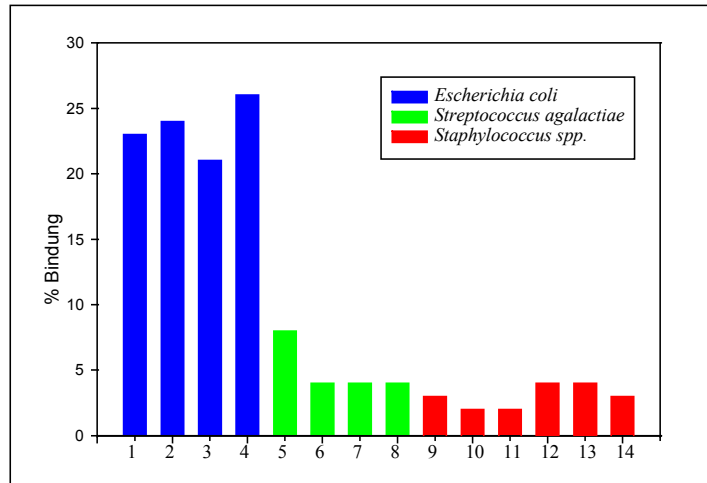


Abbildung 4: Bindung von verschiedenen Bakterienstämmen an ^{125}I -markiertes hLf. 1-4: *E. coli*, 1: DH5 α ; 2: HB101; 3: JM109; 4: M15 pREP4; 5-8: *S. agalactiae* (klinische Isolate), 5: B12; 6: B166; 7: B169; 8: B174; 9-14: *Staphylococcus spp.*, 9: DSM3269; 10: DSM20044; 11: DSM20036; 12: DSM20038; 13: DSM20260; 14: DSM20263. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von dreifach-Bestimmungen.

Die Bindungsversuche mit ^{125}I -hLf an Pneumokokken entsprachen der oben beschriebenen Vorgehensweise. Zur Präzipitation der Zellen nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 ml einer Suspension von *Staphylococcus warneri* in PBST.

3.14.8.4 Kompetitive Inhibition der radioaktiv-markierten Proteine im Bindungsversuch

Zur Untersuchung, ob bestimmte Proteine die Bindung von markierten Proteinen an die Oberfläche von Bakterien kompetitiv inhibierten, wurden verschiedene Konzentrationen der möglichen Inhibitoren (0,2 ng bis 100 μg) in PBS gelöst und mit 250 μl der auf 10% Transmission eingestellten Pneumokokkensuspension für 20 Minuten bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden 37 nCi / 25 μl des iodierten Proteins (80000 cpm) jedem Ansatz zugefügt und es folgte eine weitere Inkubation für 25 Minuten bei 37°C. Danach wurden die Pneumokokken mit 1 ml einer Suspension von *Staphylococcus warneri* in PBST präzipitiert und nach Entfernen des Überstandes die Aktivität bestimmt.

3.14.8.5 Berechnung der Bindungskonstanten - Darstellung nach Scatchard (Scatchard, 1949)

Für die Berechnung der Bindungskonstanten erfolgte zunächst die Berechnung an gebundenem und nicht-gebundenem humanen Lactoferrin (in nM). Bei der Darstellung nach Scatchard wurde der Quotient von gebundenem/freiem Lactoferrin gegen das gebundene Lactoferrin (in nM) graphisch dargestellt. Aus den Schnittpunkten der sich ergebenden Graphen mit den Achsen lassen sich die Bindungskonstanten vereinfacht berechnen: x-Wert/y-Wert.

3.14.9 Aufreinigung von His-tag-Fusionsproteinen

Bei diesen Fusionsproteinen handelte es sich um Proteine, die bei der Verwendung des pQE-30-Klonierungsvektors im N-terminalen Bereich ein Hexapeptid von Histidinen - ein His-tag - aufweisen. Dieses Hexapeptid hatte eine hohe Affinität zu Nickel-Ionen, die in dem starken Chelat-Bildner Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA) komplexiert waren. Das NTA war seinerseits an ein Trägermaterial (Agarose) gekoppelt. Vor der Aufreinigung erfolgte zunächst die Überexpression der Fusionsproteine. Bei *E. coli*-Kulturen, die pQE-30-Plasmide und deren Derivate mit IPTG-induzierbaren Promotoren enthielten, erfolgte die Überexpression für 4 Stunden bei 28°C. Die Bakteriensuspensionen wurden anschließend bei 4°C zentrifugiert, vom Überstand befreit und bei -20°C eingefroren oder in Puffer 1 der jeweiligen Aufreinigung - nativ oder denaturierend - resuspendiert. Es folgte der zweimalige Zellaufschluß der Bakterien mit der 'French® Pressure Cell', bei einem konstanten Druck von 1000 psi. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem 'Econo System' der Firma Bio-Rad. Dazu wurde eine Ni-NTA-Säule (5 ml Bettvolumen) zunächst mit dem Puffer 1 äquilibriert. Es erfolgte der Probenauftrag, das Waschen mit dem Puffer 2 und die anschließende Elution des Fusionsproteins mit einem linear steigenden Imidazolgradienten. Durch das Imidazol kam es zur kompetitiven Verdrängung des Fusionsproteins. Die Elution wurde mittels Photometer verfolgt und die entsprechenden Fraktionen wurden im SDS-PAGE und Coomassie-Färbung getestet, Fraktionen mit gleichem Proteingehalt vereinigt und gegen PBS dialysiert. Anschließend wurden die Proteine bei -20°C gelagert. Bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgt die Zugabe von 8 M Urea im jeweiligen Puffer. Dieses ist notwendig, wenn das überexprimierte Protein in sog. 'Inclusion-bodies' vorliegt.

3.14.10 Kolonie-Immunoblot

Mit dieser Methode können plasmidkodierte, rekombinante Proteine, die in *E. coli* exprimiert werden und zytoplasmatisch vorliegen, sehr schnell, sofern ein spezifischer Antikörper vorliegt, nachgewiesen werden. Dieses Verfahren wurde beim Testen auf Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* nach der Klonierung und Transformation angewendet, da eine hohe Anzahl von möglichen Transformanten gleichzeitig untersucht werden konnten. Hierzu wurden die erhaltenen Transformanten auf 2 Agarplatten repliziert. Eine der Agarplatten enthielt neben den benötigten Antibiotika zusätzlich 1 mM IPTG. Diese Platte wurde über Nacht bei 28°C und die zweite Platte, mit den gleichen Kolonien, wurde bei 37°C inkubiert. Ein markierter Nitrocellulosefilter wurde auf die bei 28°C inkubierte Bakterienplatte aufgelegt und nach 3 Minuten mit der Kolonieseite nach oben auf ein chloroformgetränktes Filterpapier gelegt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten erfolgte die Lyse der Zellen unter gleichzeitiger Absättigung des Filters in Kolonielysepuffer für 1 Stunde bei 37°C unter Schwenken. Nach dem Entfernen von Kolonieresten mit einem Zellulosepapier erfolgte die Weiterentwicklung der Filter wie unter 3.17.1 beschrieben.

3.14.11 Herstellung von polyklonalen Antikörperseren

Als Grundlage der Immunisierung dienten aufgereinigte Fusionsproteine, mit denen Kaninchen subkutan immunisiert wurden. Die Herstellung erfolgte bei der Firma EUROGENTECH (Belgien). Die erhaltenen Proben gliederten sich in Prä-Immunserum, erstes Testserum (erste Immunisierung), zweites Testserum (Booster) und Ausblutungsserum.

3.14.12 Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979)

Die durch SDA-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der 'Transblot Semi Dry Transfer Cell'-Elektrophoreseapparatur der Firma Bio-Rad auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran übertragen. Bei der Verwendung von Nitrozellulosemembranen wurden diese mit dem Proteingel für 20 Minuten im 'Semi-Dry-Blotting'-Puffer äquilibriert. Wurde eine PVDF- (Nylon-)Membran verwendet, mußte diese erst für einige

Sekunden in HPLC-reinem Methanol aktiviert, anschließend gewässert und in 'Semi-Dry-Blotting'-Puffer äquilibriert werden. Für den Transfer wurden zwischen den beiden Graphitplattenelektroden auf die Kathodenplatte zunächst eine Lage puffergetränktes Whatmanpapier, darauf die Membran, das Gel und zum Abschluß erneute eine Lage getränktes Whatmanpapier gelegt. Der Transfer erfolgte für 20 Minuten bei 15 Volt. Die weitere Bearbeitung der transferierten Proteine erfolgte wie unter 3.17.1 beschrieben.

3.14.13 Probenvorbereitung zur Proteinsequenzierung

Für die N-terminale Proteinsequenzierung wurden die Bakterienlysate je nach Proteingröße in einem SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet, mit Coomassie oder Ponceau-S angefärbt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und entfärbt und getrocknet der Sequenzierung zugeführt. Für die Sequenzierung interner Peptide wurden die Proteine direkt im Gel mit Coomassie angefärbt, die entsprechende Proteinbande wurde ausgeschnitten und in PBS bis zur Sequenzierung gelagert. Die weitere Behandlung und Sequenzierung erfolgte mit einem 'Applied Biosystem' Gerät von Dr. M.Kieß und Frau Getzlaff, Abteilung Molekulare Strukturforchung der GBF.

3.15 Konstruktion einer *S. pneumoniae* Genbank im λ_{Zap} Express™ Vektor

Für die Herstellung einer genomischen Genbank von *S. pneumoniae* wurde zunächst die chromosomale DNA partiell mit *Sau3A* verdaut, so daß DNA-Fragmente von 2 bis 9 kb erhalten wurden, die mit dem λ_{Zap} Express™ Vektor ligiert wurden. Dieser Ligationsansatz wurde mit dem 'Gigapack® III Gold Packaging Kit' in Phagen verpackt. Die Effizienz der Verpackung wurde durch Infektion eines geeigneten *E. coli*-Stammes mit verschiedenen Verdünnungen der Genbank bestimmt. Für die Herstellung mußte zunächst die isolierte chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten werden. Hierzu wurde eine serielle Verdünnung des Enzyms zu einer konstanten Menge an DNA (10 µg) gegeben und für eine Stunde bei 37°C mit dem KGB-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut. Die Enzymverdünnung, die eine Fragmentgröße der verdauten DNA von 2,0 kb bis 9,0 kb ergab, wurde für den Verdau eines Großansatzes (100 µg DNA) verwendet. Der Ansatz wurde danach phenolisiert und die DNA mit Isopropanol und 3 M NaAc (pH 5,2) gefällt. Es folgte eine weitere Auftrennung der benötigten Fragmente durch die Ultrazentrifugation in einem NaCl-Gradienten. Die Ausbildung eines NaCl-Gradienten wird durch das Einfrieren und Auftauen einer 20%igen NaCl-Lösung in Zentrifugenröhrchen bei -20°C erreicht. Die DNA wurde vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und für 2 Stunden in einer Ultrazentrifuge (Sorvall) bei 39000 x g im 'TST 60,4' Rotor zentrifugiert. Danach wurden Fraktionen von 200 µl gesammelt und die einzelnen Fraktionen im Agarosegel kontrolliert. Die Fraktionen mit DNA-Fragmenten von 2,0 bis 9,0 kb wurden mit 1 Volumeneinheit Isopropanol zur Abtrennung des NaCl gefällt und in 5 µl ddH₂O resuspendiert. Die Ligation mit dem *Bam*HI_vorgeschnittenen λ_{Zap} Express™ Vektor erfolgte bei 12-14°C über 2 Tage. Die verwendete T4-DNA-Ligase wurde in einer Konzentration von 1,5 U bei 1 µg Vektor, 1:10 Verdünnung des Ligase-Puffers und 2,7 µl DNA in einem Gesamtvolumen von 5 µl eingesetzt. Die Verpackung der Ligation erfolgte mit dem 'Gigapack® III Gold Packaging Kit' (Lagerung bei -80°C). Der Verpackungsansatz wurde auf Eis aufgetaut, mit 2-4 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform. Der Ansatz wurde vermischt und zentrifugiert. Der Überstand mit den DNA-enthaltenen Phagen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 20 µl Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung des Phagentiters wurde zum einen die gesamte Anzahl der Phagen der Genbank bestimmt, um zu ermitteln, ob das gesamte Genom statistisch oft genug in den Phagen vertreten ist. Zum anderen wurde die Häufigkeit bestimmt, mit der der Vektor religiert hat bzw. die Ligation zwischen Vektor und

DNA-Fragmenten erfolgreich war, indem bei der erfolgreichen Klonierung die Expression des *lacZα*-Gens unterbrochen wurde und so eine blau/weiß-Selektion auf Medium mit beta-Galactosidase möglich war. Für die Titerbestimmung wurde der *E. coli* XL1-blue in LBMM-Medium angeimpft, bei 37°C bei 120 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubiert, mit LBMM-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt und zu 100 µl aliquotiert. Hierzu wurden 1 µl der Phagen in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt bis 10⁻⁵ in 100 µl SM-Puffer) pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Danach wurde jeder Ansatz mit 3 ml auf 48°C erwärmten NZY-Top-Agar, 15 µl 0,5 M IPTG und 50 µl X-Gal (250 mg/ml in DMF) versetzt und auf vorgewärmte (37°C) NZY-Platten gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Anhand der sich ergebenden blauen und weißen Kolonien konnte die Ligationseffizienz und die Gesamtphagenzahl der Genbank ermittelt werden.

3.16 Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen in der *S. pneumoniae* Genbank

Der erste Schritt bei der Identifizierung von DNA-Sequenzen, die Homologien zu bereits bekannten DNA-Sequenzen bei *S. pneumoniae* aufwiesen, erfolgte über eine erneute Infektion von *E. coli* durch die Phagen, ohne dem Zusatz von IPTG und X-Gal. Danach erfolge ein Plaquelift mit der radioaktiv-markierten Sonde, in diesem Fall der *spsA*-Repeat-Sonde. Dann folgte die Amplifizierung der positiven Phagen und *in vivo*-Excision mit dem ExAssist™/XLRL-System (Short *et al.*, 1988), so daß die klonierten DNA-Fragmente stabil in *E. coli* vorlagen. Die klonierten Genabschnitte konnten nun sequenziert und die Bindungseigenschaften eventuell exprimierter Proteine getestet werden. Die Infektionsrate von *E. coli* wurde anhand des berechneten Phagentiters so gewählt, daß sich etwa 100 Plaques pro Platte ergaben. Die in den Plaques enthaltene DNA wurde auf eine Nylonmembran für 5 Minuten bei RT, transferiert und fixiert. Es folgte eine Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten *spsA*-Repeat-Sonde unter nicht-stringenten Bedingungen (siehe 3.13.11.1). Die Phagen, die mit der Sonde hybridisierten, wurden aus dem Agar isoliert, indem der Plaque ausgestochen, mit 200 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform für 2-4 Stunden unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert wurde. Der Ansatz wurde dann zentrifugiert, der Phagen-enthaltene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über 20 µl Chloroform bei 4°C gelagert. Mit diesen Phagen wurde eine erneute Infektionsrunde mit *E. coli* und ein Plaquelift durchgeführt, um die Hybridisierung mit der Sonde zu bestätigen sowie eine Anreicherung der Phagen zu erhalten. Wenn eine Anreicherung beobachtet wurde, folgte die *in vivo*-Excision mit dem ExAssist™/XLRL-System. Hierbei wurde das DNA-Insert im Phagenvektor vom λ-Phagen zum pBK-CMV-Phagemid umgewandelt, daß stabil in *E. coli* amplifiziert werden konnte. Eine effiziente Excision wurde durch den Helferphagen ExAssist™ erreicht. Dieser enthält eine *amber*-Mutation, die eine Replikation in einem 'non-suppressing' *E. coli*-Stamm wie XLRL verhindert, so daß nur das ausgeschnittene Phagemid im Wirtstamm replizieren konnte. Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte auf Nährmedium mit Kanamycin. Für die *in vivo*-Excision wurden je 50 ml LB-Medium mit *E. coli* XL1-blue und XLRL beimpft und bei 37°C inkubiert. Die XL1-blue-Bakterien wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,2-0,5 bei 1000 x g zentrifugiert und in 10 mM MgSO₄ auf eine OD von 1,0 eingestellt. 200 µl dieser Bakterien wurden mit 250 µl Phagen, die mindestens einmal vorher amplifiziert wurden, und 1 µl ExAssist™-Helferphagen vermischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 3 ml LB-Medium erfolgte eine weitere Inkubation für 4 Stunden bei 37°C und 120 upm. Anschließend wurde der Ansatz für 15 Minuten im Wasserbad bei 70°C erhitzt, um die Bakterienzellen abzutöten, und für 15 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand, der die Phagemide enthielt, wurde mit dem *E. coli* XLRL, der bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubiert wurde, ausplattiert. Hierzu wurden 10 µl und 100 µl der Phagemide mit je 200 µl der XLRL-Zellen vermischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium, erfolgte eine erneute

Inkubation für 45 Minuten bei 37°C. Von diesem Ansatz wurden je 200 µl auf LB-Platten mit Kanamycin über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden in Flüssigmedium angezogen und es folgte eine nähere Charakterisierung der Einzelklone über eine Plasmidpräparation und Proteinanalysen.

3.17 Immunologische Methoden

3.17.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach der Bindung an Nitrozellulose- oder Nylonmembranen konnten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für eine Stunde in PBS mit 10% Magermilch abgesättigt. Beim direkten Nachweis ist der Antikörper oder das Protein, dessen Bindung nachgewiesen werden sollte, direkt mit einem Farbreaktion katalysierenden Enzym konjugiert oder radioaktiv markiert (iodierte Proteine). Beim indirekten Nachweis wurden ein oder zwei weitere Antikörper benötigt, die jeweils die vorangegangenen Proteine oder Antikörper erkannten. Der letzte dieser Antikörper war mit einem Enzym konjugiert, das eine Farbreaktion katalysierte. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:200 (bei polyklonalen Antikörpern der Firma Eurogentech) in PBS verwendet. Die Inkubation mit der Membran erfolgte für 1 Stunde bei RT unter Schwenken. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Bei den verwendeten konjugierten Enzymen handelte es sich um eine aus Meerrettich isolierten Peroxidase (HRP - horse raddish peroxidase), die mit 4-Chloro-1-naphthol und Wasserstoffperoxid die Reaktion von Chloronaphthol zu einem blauen Farbstoff katalysierte. Diese Reaktion wurde durch Waschen mit PBS und Wasser unterbrochen. Bei der Verwendung von iodierten Proteinen wurde die Membran mit einer Aktivität von 0,23 µCi/ml in PBST für 1-2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde diese dreimal für je 20 Minuten in PBS gewaschen. Die Detektion der Bindung erfolgte durch Autoradiographie mit einer Expositionszeit von 1 Tag bei Raumtemperatur und von 7 Tagen bei -80°C.

3.17.2 Verfahren zum Testen auf Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Bei diesem Verfahren wurden, von einer Einzelkolonie ausgehend, etwas Bakterienmaterial von einer Agarplatte oder die Bakterien einer 1 ml Flüssigkultur in ca. 100 µl Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Das SDS und die hohe Temperatur führten zu einem vollständigen Zellaufschluß und das Lysat konnte sofort auf ein Proteingel aufgetragen werden. Es folgte eine Coomassie-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels oder ein Western-Blot.

3.17.3 SPOT-Synthese von Aminosäuren auf eine Membran (Frank, 1992 und 1995)

Dieses Verfahren diente der Identifizierung von speziellen Bindungsdomänen in einem bestimmten Protein. Hierzu wurde bei der SPOT-Synthese ein geordnetes zweidimensionales Raster von Peptiden auf eine Zellulosemembran gebracht. Die Primärsequenz des zu untersuchenden Proteins wurde in sich überlappende Abschnitte von 15 Aminosäuren eingeteilt. Die Überlappung betrug jeweils 12 Aminosäuren, so daß ein SPOT von dem anderen durch 3 Aminosäuren unterschiedlich war. Bei dem zu untersuchenden Protein handelte es sich um den N-terminalen Bereich von PspA und die Bindungsdomäne der Lactoferrin-Bindung sollte bestimmt werden. Die Herstellung der Membran erfolgte von Herrn Dr. Ronald Frank, Arbeitsgruppe 'Molekulare Erkennung' der GBF. Zur Identifizierung der Bindungsdomäne wurde die Membran mit einigen Tropfen Ethanol befeuchtet. Dieses diente zur besseren Benetzung der Oberfläche mit Puffer. Die Membran wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBS gewaschen und über Nacht bei RT in 10 ml Blockingpuffer inkubiert. Es

folgte ein Waschschrift mit T-TBS für 10 Minuten bei RT. Um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers auszuschließen, wurde die Membran zunächst mit dem sekundären Antikörper (anti-human-Lactoferrin-Peroxidase konjugiert; 1:1000) für 1,5 Stunden in 10 ml Blockingpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit T-TBS und zweimal mit PBS für je 10 Minuten gewaschen. 10 ml der Färbelösung (Chloronaphthol mit H_2O_2) wurden hinzugefügt und unter langsamen Schwenken wurde die Farbentwicklung für 30 Minuten beobachtet. Da keine Farbreaktion zu erkennen war, konnte eine unspezifische Reaktion des Antikörpers ausgeschlossen werden. Die Membran wurde anschließend erneut dreimal mit TBS, einmal mit T-TBS gewaschen und mit dem humanen Lactoferrin (100 μg) für 4 Stunden in Blockingpuffer bei RT inkubiert. Dann wurde dreimal mit T-TBS gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit dem anti-Lactoferrin-Antikörper. Da nach 30 Minuten nur eine leichte Farbreaktion zu erkennen war, wurde die Membran über Nacht weiter inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen.

3.18 Versuche zur Eisenaufnahme

3.18.1 Wachstumsstudien unter eisenlimitierten Kulturbedingungen

3.18.1.1 Deferrierung des Eisenchelators EDDHA (Rogers, 1973)

Der Eisenchelator Ethylendiamindihydroxy-Essigsäure (EDDHA) wurde eisengesättigt geliefert und mußte vor der Nutzung deferriert werden. Hierzu wurden 4 g EDDHA in vorher zum Sieden gebrachter 1 M HCl gelöst und erneut bis zum Sieden erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde zur Abtrennung des ausgefallenen Eisens durch einen Whatman-Filter No.1 filtriert. Diese Lösung wurde anschließend mit 600 ml Aceton über Nacht auf Eis gefällt. Das ausgefallene EDDHA wurde durch Filtration mit einem Filter der Firma Schleicher & Schuell (No.591) abgetrennt, mit eiskaltem Aceton gewaschen und bei RT getrocknet. Dieser Vorgang mußte dreimal wiederholt werden, um das EDDHA maximal eisenfrei zu bekommen. Für die 0,2 M EDDHA-Stocklösung wurde EDDHA in 1 M NaOH gelöst, mit konzentrierter HCl ein pH von 9,0 eingestellt, mit ddH₂O aufgefüllt und steril filtriert.

3.18.1.2 Bestimmung der wachstumshemmenden EDDHA-Konzentration

Um zu zeigen, daß eine bestimmte Substanz als Eisenquelle zum Wachstum von *S. pneumoniae* genutzt werden konnte, mußte zunächst die Konzentration an EDDHA ermittelt werden, bei der das Wachstum aufgrund des Eisenmangels gehemmt wurde. Hierzu wurde eine Kultur von *S. pneumoniae* in THY bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Medien mit den verschiedenen EDDHA-Konzentrationen (über Nacht in THY) wurden mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,08 mit den Bakterien angeimpft und bei 37°C inkubiert. Zur Aufnahme einer Wachstumskurve wurde mindestens stündlich die OD₆₀₀ bestimmt. Die Konzentrationen von EDDHA lagen bei 0 mM (Positivkontrolle) bis 20 mM.

3.18.2 Wachstum mit Hämin, Hämoglobin und Lactoferrin als Eisenquelle

(Tai et al., 1993)

Die Wachstumsversuche in eisenlimitierten Medien supplementiert mit Hämin, Hämoglobin oder Lactoferrin entsprachen in der Durchführung der Ermittlung der EDDHA-Konzentration. Eine Kultur von *S. pneumoniae* in THY mit einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 wurde abzentrifugiert und in PBS gewaschen. Im Folgenden wurden verschiedene Ansätze mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,1 angeimpft: THY ohne Zusätze; THY + die für den ausgewählten Stamm identifizierte EDDHA Konzentration; THY + EDDHA + 8 μM Hämin als Eisenquelle (Positivkontrolle), THY + EDDHA + Hämoglobin (5 μM), sowie THY + EDDHA + verschiedene Lactoferrin-Konzentrationen (2 μM , 5 μM , 10 μM und 50 μM). Die entsprechenden Ansätze wurden bereits einen Tag vorher mit der wachstumslimitierenden EDDHA-Konzentration versetzt, die

Zugabe der Eisenquelle erfolgte frisch. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Für die Aufnahme der Wachstumskurven wurde die OD₆₀₀ stündlich bestimmt. Da EDDHA ebenfalls Eisen aus Glasmaterial herauslösen kann, wurden bei den Versuchen nur Plastikgefäße verwendet.

3.18.3 Expression von Proteinen unter Eisenlimitation, sowie Lactoferrin-Supplementation

Um Proteine zu identifizieren, die nur unter eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen exprimiert wurden, wurde bei jeder Messung der OD₆₀₀ aus den verschiedenen Ansätzen eine Probe entnommen, abzentrifugiert und in Probenpuffer aufgenommen. Diese Proben wurden anschließend in einem denaturierenden bzw. nicht-denaturierenden PAGE aufgetrennt und entweder Coomassie-gefärbt oder in der Western-Blot Analyse verwendet.

3.18.4 Spezifische Bindung von Lactoferrin an Pneumokokken

Die spezifische Bindung von Lactoferrin an verschiedene *S. pneumoniae*-Stämme wurde radioaktiv im Bindungsversuch und im radioaktiven und nicht-radioaktiven Western-Blot getestet.

3.18.5 Untersuchung der Proteaseaktivität von Pneumokokken und Proteinen, die an eine feste Phase gebunden sind (Ascencio *et al.*, 1992)

Dieser Versuch diente der Charakterisierung der Protease-Aktivität von *S. pneumoniae*-Stämmen und gereinigten Proteinen auf immobilisiertes humanes Lactoferrin. Hierzu wurde iodiertes Lactoferrin mit einer Konzentration von 46 nCi / 50 µl PBS pro Kavität einer Mikrotiterplatte gegeben, das entspricht 100.000 cpm im Radioaktivitätsmeßgerät, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Frische Kulturen von *S. pneumoniae* wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,6 zentrifugiert, gewaschen und auf eine Transmission von 10 eingestellt. Das nicht-gebundene Lactoferrin wurde dreimal mit PBS aus der Mikrotiterplatte gewaschen. 50 µl der eingestellten Stämme wurden pro Kavität für eine Stunde bei 37°C mit dem Lactoferrin inkubiert. Als Kontrollen dienten PBS, hitzeinaktivierte Zellen (10 Minuten bei 70°C), Pronase E (5 µg, 50 µg), Proteinase K (5 µg, 50 µg), Trypsin (5 µg, 50 µg), Neuraminidase (4U), gereinigtes PspA (QP2: 0,23 µg, 0,47 µg, 0,94 µg, 1,88 µg, 3,75µg), gereinigtes SpsA (SH2: 1,25 µg, 5 µg; Dr.Hammerschmidt, GBF, Braunschweig) und gereinigtes SfbI-Protein (1,25 µg, 5 µg; Frau Dr.Talay, GBF, Braunschweig). Nach der einstündigen Inkubation wurden 20 µl je Kavität in einem Gamma-Zählgerät vermessen.

3.18.6 Untersuchung der Proteaseaktivität von Pneumokokken und aufgereinigtem PspA gegenüber Lactoferrin

Dieser Versuch diente zur Charakterisierung der Protease-Aktivität verschiedener *S. pneumoniae*-Stämme und gereinigten Proteinen gegenüber löslichem humanen Lactoferrin. Hierzu wurden Kulturen in THY bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert und zum einen direkt sowie zum anderen nach Zentrifugation und Waschen auf eine Transmission 10 eingestellt. Die Bakterien wurden anschließend mit einem Volumen von 250 µl, 500 µl und 1 ml zu einer Lactoferrin-Lösung von 230 nCi in 50 µl PBS (500.000 cpm) gegeben. Als Kontrolle diente THY und PBS, sowie aufgereinigtes rekombinantes PspA-Protein (QP2: 2,5 µg, 5 µg). Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand mit 10% TCA gefällt. Die Zellen und der gefällte Überstand wurden im Gamma-Zählgerät vermessen. Um eventuelle Spaltprodukte sichtbar zu machen, wurden die Proben in Proteinprobenpuffer resuspendiert, aufgeköcht und im SDS-PAGE (16%) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf ein Whatman-Filterpapier transferiert und bei 80°C für 2 Stunden unter Vakuum getrocknet. Es erfolgte eine Autoradiographie.

Als Grundlage für diese Untersuchungen dienten publizierte Daten, die zeigten, daß im Genom von *S. pneumoniae* weitere Gene existieren, die für cholinbindende Proteine (Cbp) kodieren. Diese Cbp werden über die sogenannten ‘cholinbindenden Repeats’ an der Oberfläche von Pneumokokken nicht-kovalent gebunden. Zu den bisher bekannten Cbp gehören das Autolysin, PspA, SpsA und PcpA (Garcia *et al.*, 1986; Briles *et al.*, 1988; Hammerschmidt *et al.*, 1997; Sanchez-Beato *et al.*, 1998). Ein Vergleich der cholinbindenden Repeats auf Protein- sowie auf DNA-Basis (Abbildung 5), ergab zum Teil hohe Homologien.

Abbildung 5: DNA-Sequenzvergleich des ersten Repeats von *spsA* mit Repeats von *pspA*, *pcpA* und *lytA*; (|):übereinstimmende Nukleotide, ():unterschiedliche Nukleotide.

Diese Repeatstruktur wurde ebenfalls bei anderen Proteinen von Streptokokken (GtfC; Gbp) und Clostridien (ToxA) beobachtet, so daß angenommen wird, daß es sich bei den ‘cholinbindenden Repeats’ um einen allgemeinen Verankerungsmechanismus von Proteinen an der Bakterienoberfläche handelt (Podvin *et al.*, 1988; Wren, 1991; Yother und Briles, 1992; von Eichel-Streiber *et al.*, 1992) (siehe auch *Tabelle 3*). Dieser Verankerungsmechanismus und die zum Teil hohen Homologien der Repeats lassen vermuten, daß mehrere solcher Proteine bei Pneumokokken existieren. Dieses konnte von Sheffield, *et al.* (1992) in einem Southern-Blot bestätigt werden. Die in der *Abbildung 5* gezeigten Sequenzvergleiche ließen

vermuten, daß die Homologien der Repeats von *spsA* ausreichen, um bei der Untersuchung einer Genbank von *S. pneumoniae* mit einer Repeat-kodierenden DNA-Sonde unter nicht-stringenten DNA-Hybridisierungsbedingungen weitere, neue Gene, die für cholinbindende Proteine kodieren, zu identifizieren.

4.1.1 *S. pneumoniae* DNA-Expressionsbank im Phagen λ_{ZAP}

4.1.1.1 Southern-Blot Analyse von chromosomaler DNA von *S. pneumoniae*

Das Ziel dieser Southern-Blot Analyse war es, für die Konstruktion der Phagenbank die chromosomale DNA eines Pneumokokkenstammes auszuwählen, der möglichst viele Kopien der Repeat-kodierenden Sequenzen aufweist. Es wurde das Hybridisierungsmuster chromosomaler DNA verschiedener Pneumokokkenstämme unterschiedlichen Serotyps mit der Repeat-DNA-Sonde von *spsA* überprüft. Hierzu wurde der Repeatbereich von *spsA* vom Plasmid pSHA2 mit den Primern SH24 und SH23 amplifiziert und mit [32 P]-dCTP markiert. Die chromosomale Pneumokokken-DNA wurde mit *Hind*III verdaut und es erfolgte eine Hybridisierung des Southern-Blots mit der *spsA*-Sonde unter nicht-stringenten Bedingungen. Das Autoradiogramm ist in der *Abbildung 6* dargestellt. Bei den verschiedenen Pneumokokkenstämmen sind unterschiedliche Hybridisierungsmuster zu beobachten. Der Stamm Sp34 (Serotyp 1) zeigte neben dem bereits bekanntem Hybridisierungsmuster für *spsA* und *pspA* mindestens 6 weitere Fragmente, die mit der Repeatsonde reagierten. Dieser Stamm wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

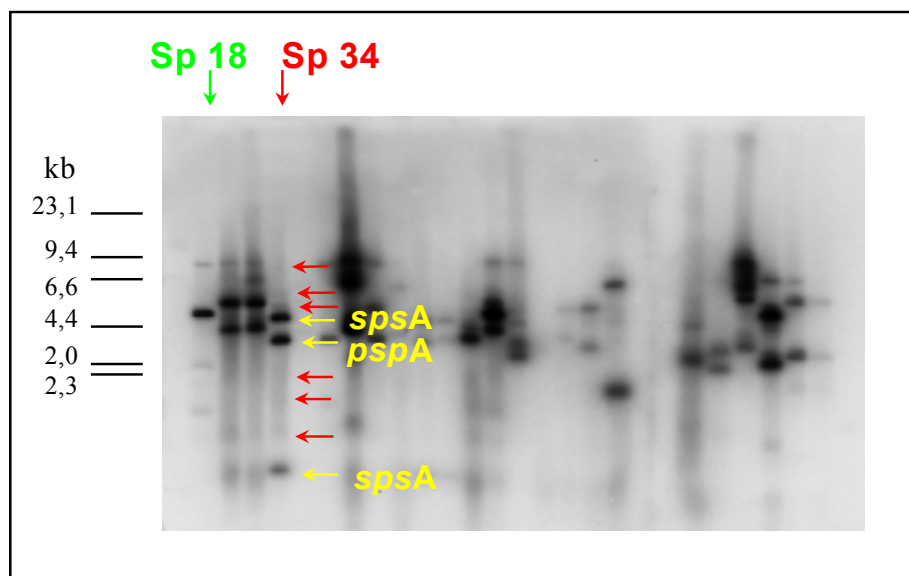


Abbildung 6: Southern-Blot Analysen der *Hind*III geschnittenen chromosomalen DNA von *S. pneumoniae* mit einer *spsA*-Repeatsonde. Pos. 1: Sp18, Pos. 2: Sp21, Pos. 3: Sp24, Pos. 4: Sp34, Pos. 5: Sp35, Pos. 6: Sp36, Pos. 7: Sp37, Pos. 8: Sp41, Pos. 9: Sp51, Pos. 10: Sp52, Pos. 11: Sp53, Pos. 12: Sp54, Pos. 13: Sp55, Pos. 14: Sp56, Pos. 15: Sp57, Pos. 16: Sp58, Pos. 17: Sp59, Pos. 18: Sp60, Pos. 19: Sp61, Pos. 20: Sp62, Pos. 21: Sp63, Pos. 22: Sp64.

4.1.1.2 Untersuchung der *S. pneumoniae* DNA-Expressionsbank im Phagen λ_{ZAP}

Für das Screening mit der *spsA*-Repeatsonde konnte eine bereits vorhandene DNA-Expressionsbank von *S. pneumoniae* des Serotyps 1 (Sp34) verwendet werden (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Die Überprüfung der vorhandenen Genbank ergab eine Plaque-Forming-Unit (PFU) von $6,1 \times 10^5$ Phagen/ml. Der Anteil der Phagen mit religiertem Vektor, d.h. ohne chromosomalem *S. pneumoniae*-DNA-Insert, betrug 16 %. Zur weiteren Untersuchung der Genbank wurden *E. coli*-Bakterien (XL1-blue MRF') mit den Phagen infiziert und nach einem Plaquelift wurden die Nylonmembranen mit der radioaktiv-markierten *spsA*-Repeatsonde unter nicht-stringenten Bedingungen (42°C) hybridisiert. Die Phagen, die mit der Sonde hybridisierten, wurden isoliert. Zur Anreicherung wurden erneut XL1-blue MRF'-Bakterien infiziert und auf eine erneute Hybridisierung mit der Repeat-kodierenden DNA-Sonde getestet. Bei positivem Ergebnis wurden die rekombinanten Phagenklone durch *in vivo*-Excision in rekombinante pBK-CMV-Phagemide im rekombinanten *E. coli*-Stamm XL0LR überführt. Diese Phagemide wurden anschließend aus dem XL0LR-Stamm durch eine Mini-Plasmid DNA-Präparation isoliert und das Molekulargewicht sowie das Restriktionsmuster der integrierten DNA-Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *PstI*, *XbaI* und *SalI* bestimmt. Bei einer Größe der linearen Fragmente von mindestens 1,5 kb wurde die Plasmid-DNA für weitere Analysen mit dem Maxi-Plasmid DNA-Kit präpariert. Die integrierten DNA-Fragmente wiesen zum größten Teil eine Größe von 5-6 kb auf, Fragmente mit einer Größe kleiner 2 kb und größer 9 kb wurden nicht beobachtet (Abb.7).

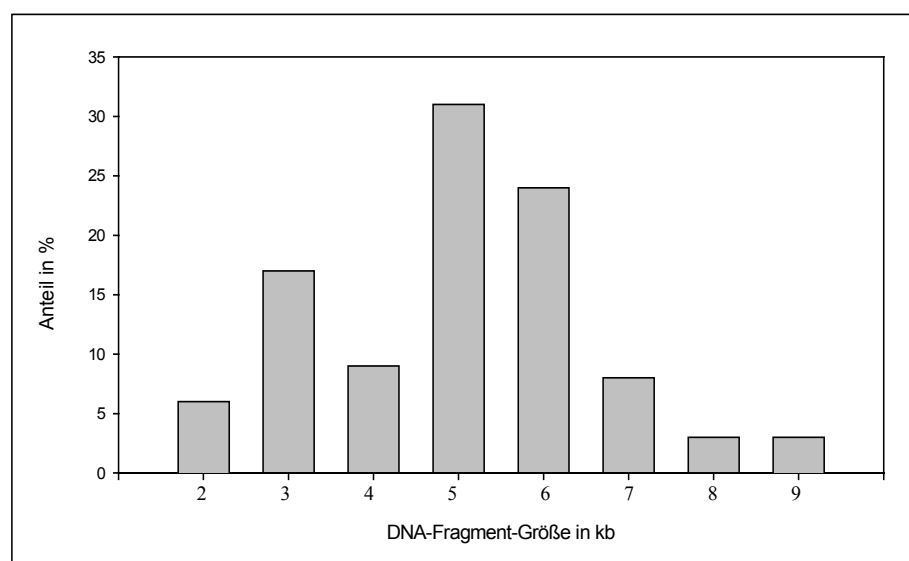


Abbildung 7: Größenverteilung der in den pBK-CMV inserierten Pneumokokken-DNA-Fragmente.

4.1.1.3 Southern-Blot Analyse der *S. pneumoniae* Genbank

Mit den folgenden Southern-Blot Analysen sollten die rekombinanten Plasmide bestimmt werden, die Sequenzen enthielten, die für bereits bekannte cholinbindende Proteine kodierten. Dazu wurden die rekombinanten Plasmide linearisiert, im Agarosegel aufgetrennt und in anschließenden Southern-Blot Analysen auf eine Hybridisierung mit den 5'-Bereichen einer *pspA*-, *spsA*- und *lytA*-spezifischen DNA-Sonde untersucht (Abb.8).

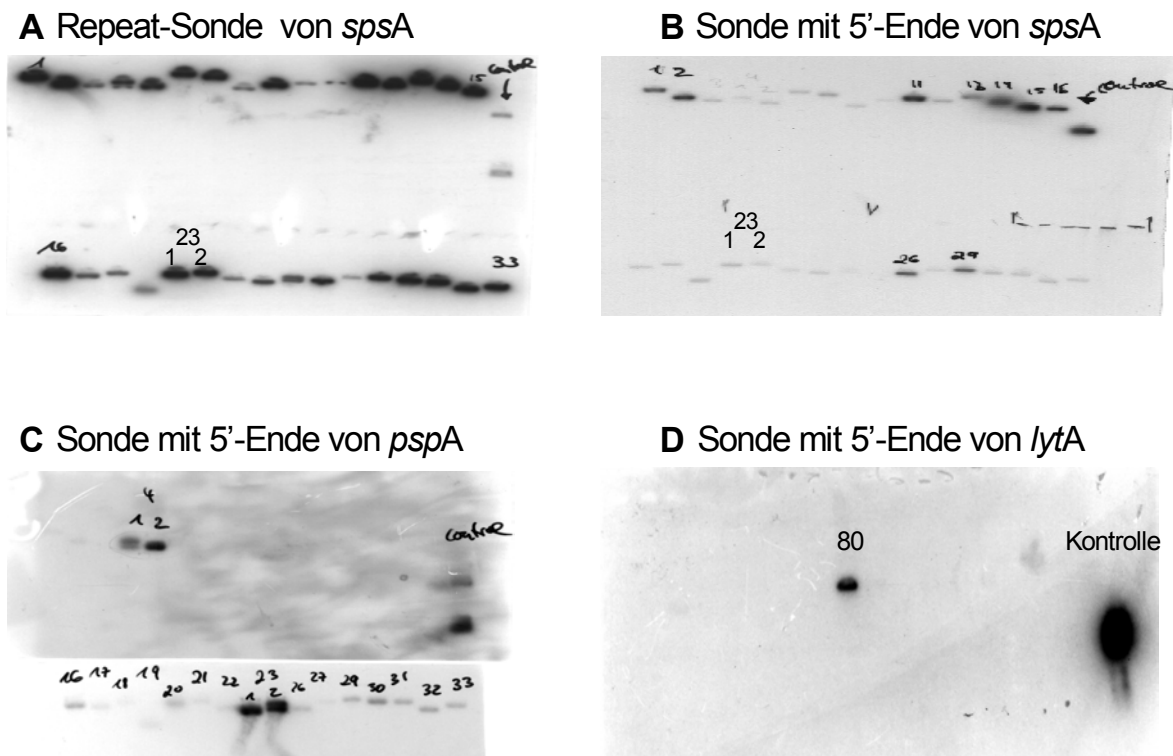


Abbildung 8: Southern-Blot Analysen von 32 (von 80) rekombinanten Plasmiden mit **A:** der Repeat-DNA-Sonde von *spsA* (von nt 1254 bis nt 1853); **B:** der DNA-Sonde vom 5'-Bereich von *spsA* (von nt 283 bis nt 1253); **C:** der DNA-Sonde vom 5'-Bereich von *pspA* (von nt 214 bis nt 1329); **D:** der DNA-Sonde vom 5'-Bereich von *lytA* (von nt 204 bis nt 728). Die Numerierung in den Abbildungen entspricht der Numerierung der isolierten Klone. Als Positivkontrolle wurde jeweils der von Sp34 amplifizierte 5'-Bereich der Gene (*spsA*, *pspA* und *lytA*) verwendet.

Mit diesen Southern-Blot Analysen konnten von den 80 insgesamt isolierten rekombinanten Plasmiden 11 als *pspA*-, 20 als *spsA*- und 1 als *lytA*-enthaltende Sequenzen identifiziert werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von Garcia *et al.* die DNA-Sequenz eines weiteren cholinbindenden Proteins - PcpA - veröffentlicht. Die Southern-Blot Analyse der unbekannten Klone mit dem 5'-DNA-Bereich von *pcpA* (von nt 2064 bis nt 3528) ergab, daß es sich bei einem isolierten Klon um eine *pcpA*-enthaltende Sequenz handelt. Da bei den isolierten Klonen sowohl *lytA*, als auch *pcpA* gefunden wurden, deren Repeatsequenzen nur zu 68%

bzw. 71% Homologien zur Repeatsequenz von *spsA* und *pspA* aufweisen (Abb.5), konnte dieser experimentelle Ansatz zur Identifizierung von Sequenzen, die für cholinbindende Proteine kodieren, bestätigt werden. Die rekombinanten Plasmide, die keine Hybridisierung mit den 5'-DNA-Bereichen von *pspA*, *spsA*, *lytA* und *pcpA* zeigten, wurden nach ihrer Reaktionsstärke mit der *spsA*-DNA-Repeatsonde im Southern-Blot in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: *i*) starke Reaktion, *ii*) mittelstarke Reaktion und *iii*) schwache Reaktion. Zunächst wurden diejenigen Pneumokokken-DNA-Fragmente sequenziert, die eine starke Hybridisierungsreaktion mit der DNA-Repeatsonde zeigten. Hierbei ergab sich allerdings, daß alle Plasmide entweder *pspA* (5x) oder *spsA* (10x) ab einer der internen *Sau3A*-Schnittstelle enthielten. Insgesamt existieren bei *spsA* sechs *Sau3A*- und bei *pspA* vier *Sau3A*-Schnittstellen. Die erhaltenen *spsA*-Sequenzen starteten bei Nukleotid 892 und die *pspA*-Sequenzen bei Nukleotid 1132. Daher wurden im weiteren Verlauf die Plasmide sequenziert, die eine mittlere bis schwache Reaktion mit der Repeatsonde zeigten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sequenzhomologien der rekombinanten Plasmide der *S. pneumoniae* Genbank zu verschiedenen bekannten Genen der Datenbanken.

Klon Nr.	Gen	Funktion	Spezies	Homologie DNA-Basis	Homologie Protein-Basis
9	<i>spi</i>	Signalpeptidase	<i>S. pneumoniae</i>	97 %	99 %
17	<i>psaA</i> ORF3	evtl. Thiolperoxidase	<i>S. pneumoniae</i>	99 %	99 %
51	<i>parC</i>	DNA-Topoisomerase IV-Untereinheit	<i>S. pneumoniae</i>	100 %	100 %
27	<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase-B-Untereinheit	<i>S. pneumoniae</i>	98 %	98 %
27	IS1167	Insertionselement	<i>S. pneumoniae</i>	91 %	95 %
147	<i>nanA</i>	Neuraminidase A	<i>S. pneumoniae</i>	76 %	87 %
147	<i>nanA</i> ORF-2	unbekanntes Protein	<i>S. pneumoniae</i>	99 %	99 %
3	<i>pepB</i>	Peptidase B	<i>S. agalactiae</i>	70 %	90 %
7	<i>sgaT</i>	evtl. Transportprotein für Pentitolsubstrat	<i>E. coli</i>	39 %	62 %
35	<i>gtfA</i>	Glukosyltransferase A	<i>S. mutans</i>	77 %	93 %
35	<i>msmG</i>	Zuckerbindungs- und Transportprotein; Permease	<i>S. mutans</i>	75 %	92 %
57	<i>manZ</i>	<i>pts</i> -Permease für den Transport von Mannose-Untereinheiten	<i>Vibrio furnissii</i>	58 %	73 %
57	Tn10	Transposon	<i>E. coli</i>	100 %	100 %
69	<i>infB</i>	Translationsinitiationsfaktor IF-2	<i>Enterococcus faecium</i>	68 %	80 %
52	<i>plsX</i>	Fettsäure/Phospholipid-Synthese	<i>Bacillus subtilis</i>	60 %	68 %
65	<i>celB</i>	<i>pts</i> -Permease für Cellobiose	<i>Bacillus subtilis</i>	45 %	68 %

Die Ergebnisse dieser Sequenzbestimmungen ergaben bereits bekannte Gene von *S. pneumoniae* wie *spi*, *psaA* ORF3, *parC*, *gyrB*, Insertionselement IS1167, *nanA* und *nanA* ORF-2. Weiterhin wurden Genabschnitte sequenziert, die eine zum Teil hohe Homologie zu Genen anderer Bakterienarten aufwiesen wie *pepB* von *S. agalactiae* und *gtfA* von *S. mutans*. Es wurden allerdings auch Pneumokokkenfragmente sequenziert, die nur sehr geringe bzw. keine Homologien zu bereits bekannten Genen der Datenbanken aufwiesen. Ein Sequenzvergleich der rekombinanten Plasmide mit der repetitiven DNA-Struktur von *spsA* ergab nur für das *gtfA*-homologe Plasmid eine Übereinstimmung auf DNA-Basis von 46% und auf Proteinbasis von 27% (Abbildung 9).

A

	10	20	30	40	50	60	
<i>gtfA</i> :	GGTGATTGGGAGGATGTTAAGCGTTTA	GGTGAGAGATATTATCTTATGTTTGATTTTATG					
	:	:::	:	::	:::	:	
<i>spsA</i> :	ACAGGATGGCTCCAATACAATGGTTCATGGTACTACCTAAACGCTAATGGT	GATATGGCG					
	10	20	30	40	50	60	

46%
Homologie

B

	10	20	
<i>GtfA</i> :	GDWEDVKRLGERYYLMF--DFM		
	:	..	:::
<i>SpsA</i> :	TGW--LQYNGSWYYLNANGDMA		
	10	20	

27%
Homologie

Abbildung 9: Sequenzvergleich zwischen einem *spsA*-Repeat von *S. pneumoniae* (Serotyp 1) und dem rekombinanten Plasmid aus der *S. pneumoniae* Genbank, das Homologien zur *gtfA* von *S. mutans* aufweist (A). Der Vergleich auf Proteinbasis ist in B dargestellt.

Bei der Glukosyltransferase A handelt es sich um ein Enzym, daß aus Sucrose ein Glukan von 1.5 kDa synthetisiert und als Sucrosephosphorylase bezeichnet wird (Robeson *et al.*, 1983). Weitere Untersuchungen ergaben, daß es sich bei *gtfA* nicht um einen potentiellen Virulenzfaktor handelt, da *gtfA*-Mutanten keine Änderung in ihrer Virulenz aufwiesen (Barletta *et al.*, 1988).

Bei der weiteren Sequenzanalyse der *gtfA*-homologen Sequenz in *S. pneumoniae* konnte keine cholinbindende Repeatstruktur beobachtet werden. Die identifizierten Homologien zum *spsA*-Repeat erstreckten sich nur über einen Bereich von 60 Nukleotide bzw. 20 Aminosäuren.

4.1.1.4 Western-Blot Analyse der *S. pneumoniae* DNA-Expressionsbank

Für die Western-Blot Analyse wurden die Lysate der rekombinanten XL0LR-Klone im nicht-induzierten und IPTG-induziertem Status im SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung auf mögliche überexprimierte Proteine untersucht. Dieses war möglich, da sich vor den Klonierungsschnittstellen des pBK-CMV-Phagemid-Vektors ein 'lac'-Promotor befand, der IPTG induzierbar war.

Bei einigen Klonen konnten überexprimierte Proteine nachgewiesen werden. Diese wurden nach einer SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und das Protein N-terminal ansequenziert. In der *Abbildung 10* ist das Ergebnis des überexprimierten Proteins des rekombinanten *E. coli* Nummer 18 aufgeführt.

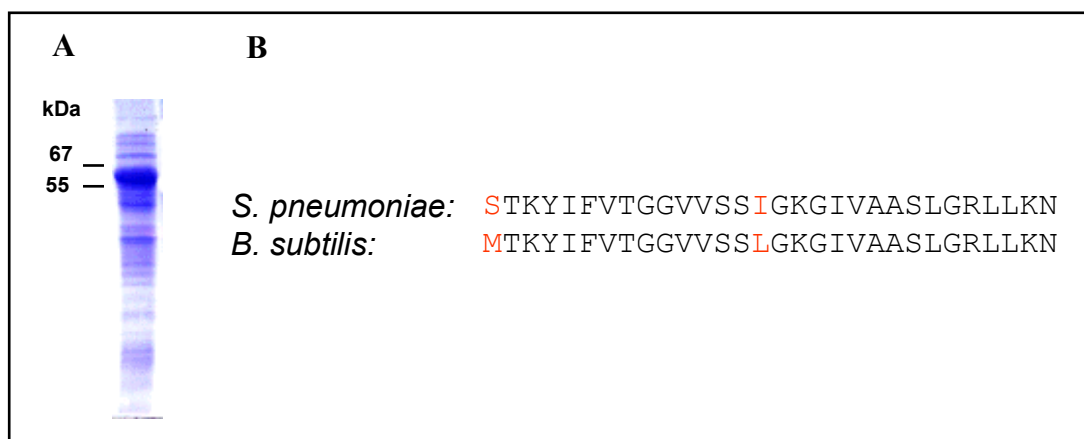


Abb. 10: A: Coomassie-Färbung eines rekombinanten *E. coli* (Klon Nr. 18) mit überexprimiertem, unbekanntem Pneumokokkenprotein; B: Alignment der ersten 30 Aminosäuren der Proteinsequenzierung (*S. pneumoniae*) und der homologen Sequenz der CTP-Synthase von *B. subtilis* aus der Proteindatenbank.

Bei dem hier gezeigten Beispiel handelte es sich um eine Homologie im N-terminalen Bereich von 96 % zu der CTP-Synthase von *Bacillus subtilis*. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Glutaminamidotransferase, die UTP, ATP und Glutamin zu CTP, ADP, Pi und Glutamat umwandelt. Ein Sequenzvergleich auf DNA-Basis ergab allerdings keine Homologien zu der repetitiven Struktur von *spsA*.

Bei einem weiteren überexprimierten Protein handelte es sich um die bereits bekannte C-Untereinheit des Pneumokokkenproteins Topoisomerase IV. Dieses Enzym ist an der DNA-Konformationsänderung beteiligt und für die C-Untereinheit konnte eine Beteiligung an der Fluoroquinolin-Resistenz nachgewiesen werden (de la Campa *et al.*, 1997). Jedoch zeigte dieses Protein ebenfalls keine Homologien zu der *spsA*-Repeatsequenz.

4.1.1.5 Bindung von humanen Serum- und Matrixproteinen an Proteine der *S. pneumoniae* DNA-Expressionsbank

Die verschiedenen, rekombinanten Klone wurden parallel auf die Bindung humaner Serum- und Matrixproteine untersucht, da Proteine mit diesen Bindungsverhalten potentielle Virulenz-faktoren sind. Hierzu wurden die rekombinanten Klone entweder direkt im Colony-Blot untersucht oder es wurden die Lysate der rekombinanten Klone in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western-Blot auf die Bindung von IgA bzw. sekretorisches IgA (SIgA), Fibronectin, Fibrinogen, IgG-Subklassen 1 bis 4, IgM, α_2 -Makroglobulin und Transferrin getestet. Hierbei wiesen nur die Klone eine Bindung von SIgA auf, die bereits vorher als SpsA-enhaltene Klone identifiziert wurden. Ansonsten erfolgte von keinem eine Bindung der getesteten Serum- oder Matrixproteine. Desweiteren wurde die Bindung der Klone von humanem Lactoferrin untersucht. Der Immunoblot zeigte nur bei einem Klon (Klon 23) eine deutliche Reaktion (*Abb. 11*). Dieser hatte bereits in der Southern-Blot Analyse mit der *pspA*-Sonde eine sehr starke Reaktion gezeigt (Klon 23-1, *Abb. 8 C*).

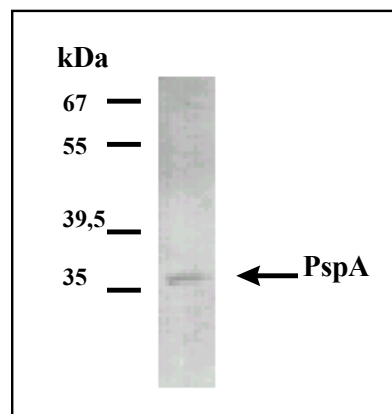


Abbildung 11: Western-Blot Analyse des Proteinlysates des rekombinanten *E. coli* (Klons 23-1). Bindung von humanem Lactoferrin.

Die nähere Charakterisierung der Bindung von humanem Lactoferrin an PspA und die biologische Funktion dieser Bindung werden im Ergebnisteil 4.2 beschrieben.

Eine Gesamtanalyse aller Ergebnisse ergab, daß die rekombinanten Plasmide, die mit der *spsA*-Repeatsonde stark reagierten, entweder *pspA*-, *spsA*- oder *lytA*-Sequenzen als DNA-Fragmente enthielten. Die Analyse der rekombinanten Plasmide, die nur eine mittlere bis schwache Reaktion mit der Sonde zeigten, ergaben bei der anschließenden Sequenzierung, bis auf eine Ausnahme, keine Homologien zur *spsA*-Repeatregion und damit keine Homologien

zu Sequenzen, die für cholinbindende Proteine kodieren. Die Ausnahme bildete der Klon mit dem *pcpA*-Gen, der nur eine schwache Reaktion mit der Repeatsonde aufwies.

4.1.2 Computer-unterstützte Identifizierung kodierender Sequenzen neuer cholinbindender Proteine

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das zum größten Teil sequenzierte, aber noch nicht annotierte Genom eines Pneumokokkenstammes des Serotyps 4 in der TIGR-Datenbank frei zugänglich (Tettelin *et al.*, 2001), so daß ein weiterer, Computer-basierter Ansatz zur Identifizierung neuer cholinbindender Proteine gewählt wurde. Das gesamte translatierte Genom wurde mit einem speziellen Suchprogramm auf Homologien zu der Repeatsequenz von SpsA untersucht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/unfinishedgenome.html>). Hierbei konnten 9 Sequenzen identifiziert werden, die auf Proteinebene eine Homologie von 100% bis 40% und alle eine konserviertes Motiv 'WYY' oder 'WYF' in ihrer Struktur aufwiesen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht über die zur SpsA-Repeatstruktur homologen Sequenzbereiche im translatierten Pneumokokkengenom der TIGR-Datenbank.

Genom- abschnitt	homologe Sequenz zu SpsA TGWKQENG WYF YNTDGSMA	Homologie zu SpsA in %	Anzahl der Repeats	Anzahl der Aminosäuren	Protein
4106	TGWKQENG WYF YNTDGSMA	100	10	693	SpsA
4242	TGWKQENG WYF YNTDGSMA	100	10	756	PspA
4239	TDWKYENG WYF YNTDGSMA	95	3	156	?
4139	QGWHKKAND WYF YKTDGSRA	55	10	627	? (CbpE)
4256-1	TGWQYLG WYY LRSSGAMA	60	7	332	? (CbpJ)
4215	TGWYKENG WYY LDEAGIMK	50	6	211	? (CbpI)
4256-2	TDWQKVNG WYY LNSNGAMV	45	2	153	? (CbpG)
4103	TGWQYLG WYY LHSSGAMA	40	5	238	? (CbpF)
4251	IIII WYY NQTLVWLMVRYRL	-	-	20	-

Neben PspA und SpsA konnten 6 bis dahin unbekannte Proteine identifiziert werden, die eine unterschiedliche Anzahl an cholinbindender Repeats aufwiesen. Eine Übersicht über den Aufbau der Proteine im Vergleich zu PspA ist in *Abbildung 12* dargestellt.

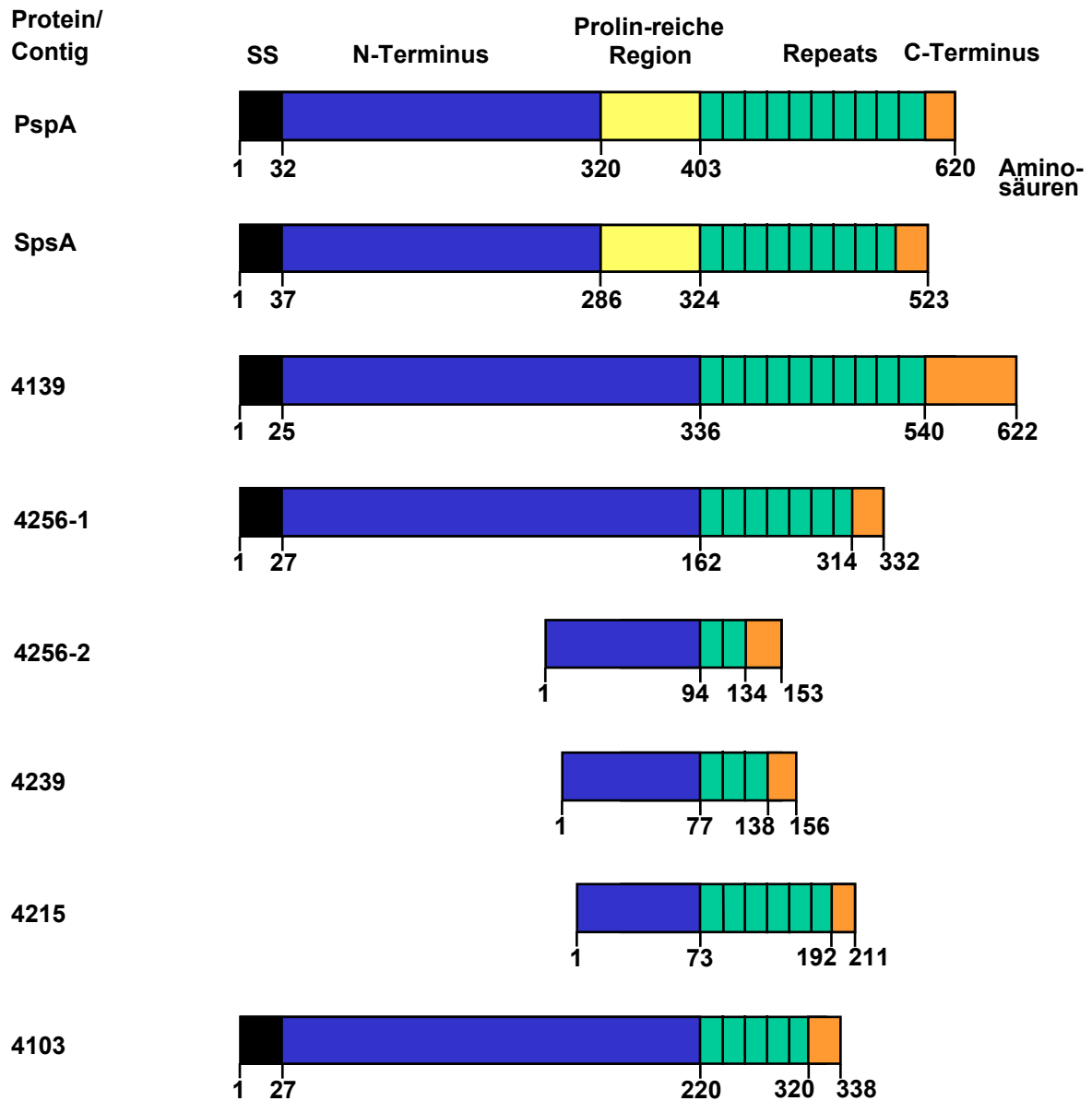


Abbildung 12: Schaubild zum Aufbau der cholinbindenden Proteine von *S. pneumoniae*. PspA und SpsA im Vergleich zu 6 weiteren im Genom vom Serotyp 4 durch Computeranalyse identifizierten Cbp.

Die kleinsten der identifizierten cholinbindenden Proteine sind aus dem Contig 4256-2 mit 153 Aminosäuren, einem berechneten Molekulargewicht von 17,5 kDa und 2 Repeats (*Abbildung 13A*) und dem Contig 4239 mit 156 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 17,9 kDa und 3 Repeats (*Abbildung 13B*). Bei diesen Proteinen konnten keine

Signalsequenzen, keine besonderen Bindungsmotive und keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen gefunden werden.

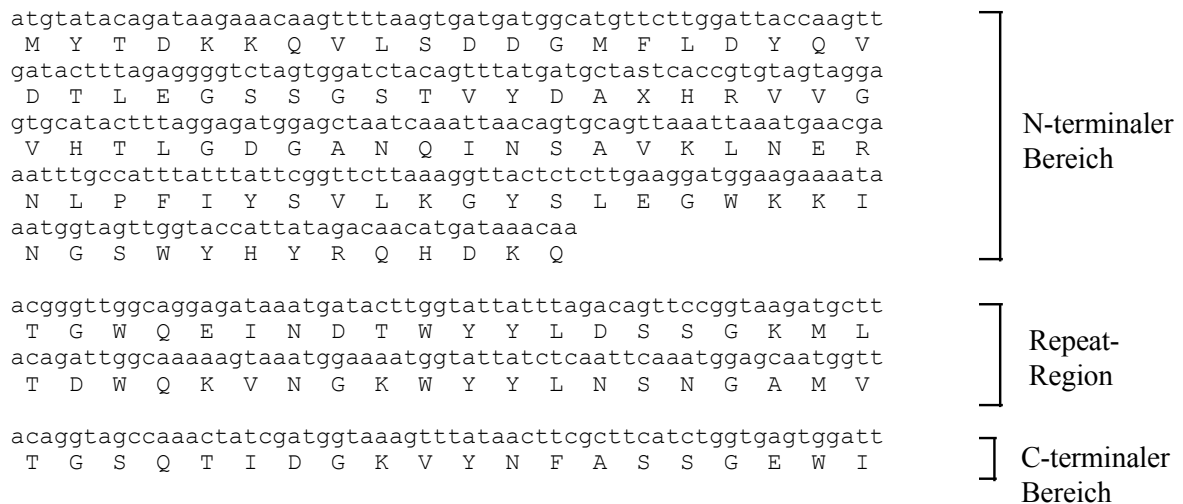


Abbildung 13A: DNA- und Proteinsequenz des offenen Leserasters im Genomabschnitt 4256-2, das für ein cholinbindendes Protein kodiert; CbpG (Gosink *et al.*, 2000).

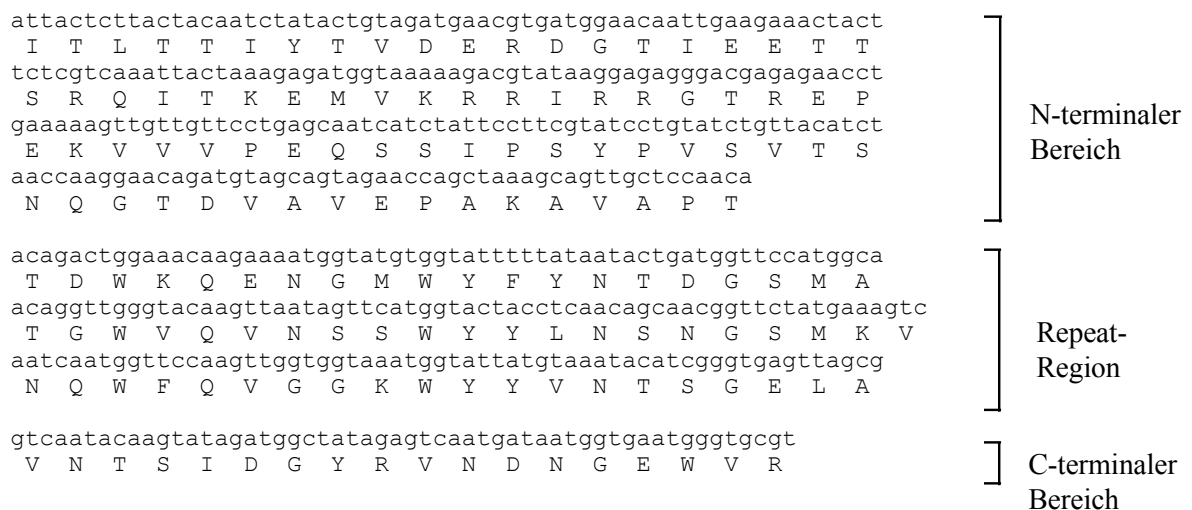


Abbildung 13B: DNA- und Proteinsequenz des offenen Leserasters im Genomabschnitt 4239, das für ein cholinbindendes Protein kodiert.

Das cholinbindende Protein des Genomabschnitts 4215 weist 211 Aminosäuren und 6 Repeats auf, das berechnete Molekulargewicht ist 23,4 kDa (Abb. 13C). Die nähere Untersuchung dieses Proteins ergab ebenfalls keine Signalsequenz, keine Bindungsmotive und keine Homologien zu anderen Proteinen.

atggggatggcagctttttaaaaaatcctaacaatcaatacaaaagctattacaattgctcaa	N-terminaler Bereich
M G M A A F K N P N N Q Y K A I T I A Q	
actctaggtgatgatgcttcttcagaggaattggctggtagatatggttctgctgttcag	
T L G D D A S S E E L A G R Y G S A V Q	
tgtacagaagtgaactgctcaaacctttcaacagttaaaactaaagctacggtttagaa	Repeat-Region
C T E V T A S N L S T V K T K A T V V E	
aaaccactgaaagatttttagagcgtctacgtctgatcag	
K P L K D F R A S T S D Q	
tctggttgggtggaatctaattggtaaatgggtatttctatgagctctggtgatgtgaag	Repeat-Region
S G W V E S N G K W Y F Y E S G D V K	
acaggttgggtgaaaacagatggtaaatgggtactatttgaatgacttaggtgtcatgcag	
T G W V K T D G K W Y Y L N D L G V M Q	
actggatttgaataatttctggtagctggtattactttagcaattcaggtgctatgttt	Repeat-Region
T G F V K F S G S W Y Y L S N S G A M F	
acaggctgggaacagatggttagcagatggttctactttgacggctcaggagctatgaag	
T G W G T D G S R W F Y F D G S G A M K	
acaggctggtacaaggaaaatggcacttgggtattaccttgacgaagcaggtatcatgaag	Repeat-Region
T G W Y K E N G T W Y Y L D E A G I M K	
acaggttgggttaaagtcggaccacactgggtactatgcctacggttcaggagctttggct	
T G W F K V G P H W Y Y A Y G S G A L A	
gtgagcacaacaacaccagatggttacggtgtaaattggtgaatgggtaaac	C-terminaler Bereich
V S T T T P D G Y R V N G N G E W V N	

Abbildung 13C: DNA- und Proteinsequenz des offenen Leserasters im Genomabschnitt 4215, das für ein cholinbindendes Protein kodiert; CbpI (Gosink *et al.*, 2000).

atgaagcttttgaaaaaaatgatgcaaatcgactagccacatttttcttcggtttgtta	Signal-sequenz
M K L L K K M M Q I A L A T F F F G L L	
gcgacaaatacagtattt	
A T N T V F	
gcagatgattctgaaggatggcagtttgtccaagaaaatggt	
A D D S E G W Q F V Q E N G	
agaacctactacaaaaaggggatctaaaagaaacctactggagagtgatagatgggaag	
R T Y Y K K G D L K E T Y W R V I D G K	
tactattattttgatcctttatccggagagatggttgtcggtggcaatatatacctgct	
Y Y Y F D P L S G E M V V G W Q Y I P A	
ccacacaagggggttacgattggtccttctccaagaatagagattgctcttagaccagat	
P H K G V T I G P S P R I E I A L R P D	
tggttttattttggtcaagatggtgtattacaagaatttgggtggcaagcaagtttagaa	
W F Y F G Q D G V L Q E F V G K Q V L E	
gcaaaaactgctacgaataccaacaacatcatggggaagaatatgatagccaagcagag	
A K T A T N T N K H H G E E Y D S Q A E	
aaacgagtctattattttgaagatcagcgtagttatcatactttaaaaactggttggatt	
K R V Y Y F E D Q R S Y H T L K T G W I	
tatgaagagggtcattggtattatttacagaaggatggtggctttgattcgcgcataac	
Y E E G H W Y Y L Q K D G G F D S R I N	
agattgacggttgagagctagcacgtggttgggttaaggattaccctcttacgtatgat	
R L T V G E L A R G W V K D Y P L T Y D	
gaagagaagctaaaagcagctccatggtactatctaaatccagcaactggcattatgcaa	
E E K L K A A P W Y Y L N P A T G I M Q	
acaggttggcaatatctaggtaatagatggtactacctccattcgtcaggagctatggca	
T G W Q Y L G N R W Y Y L H S S G A M A	
actggctggtataaggaaggctcaacttgggtactatctagatgctgaaaatggtgatatg	
T G W Y K E G S T W Y Y L D A E N G D M	
agaactggctggcaaaaccttgggaacaaatggtactatctccgttcattcaggagctatg	
R T G W Q N L G N K W Y Y L R S S G A M	
gcaactgggttatcaggaagttcgacttgggtactatctaaatgcaagtaagtggagat	
A T G W Y Q E S S T W Y Y L N A S N G D	
atgaaaacaggctggttccaagtcaatggttaactggtactatgcctatgattcaggtgct	
M K T G W F Q V N G N W Y Y A Y D S G A	
ttagctgttaataccacagtaggtggttactacttaaaactataatgggtgaatgggttaag	
L A V N T T V G G Y Y L N Y N G E W V K	

Abbildung 13D: DNA- und Proteinsequenz des offenen Leserasters im Genomabschnitt 4103, das für ein cholinbindendes Protein kodiert; CbpF (Gosink *et al.*, 2000).

Das in dem Genomabschnitt 4103 identifizierte Protein hat eine Länge von 338 Aminosäuren und ein berechnetes Molekulargewicht von 27,9 kDa. Das Protein weist 5 cholinbindende Repeats auf und von Aminosäure 1 bis 26 konnte eine Signalsequenz ermittelt werden (*Abbildung 13D*).

Das im Genomabschnitt 4256-1 gefundene cholinbindende Protein hat eine Länge von 332 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von 38,9 kDa, eine Signalsequenz (Aminosäure 1 bis 26) und 7 cholinbindende Repeats (*Abbildung 13E*).

Die Suche nach Sequenzhomologien der N-terminalen Bereiche von 4103 und 4256-1 ergab ebenfalls keine Übereinstimmung mit bekannten Proteinen der Datenbanken.

atgaaaatTTTgaaaaaaactatgcaagttggactgacagtatTTTTctTTggTTtgcta M K I L K K T M Q V G L T V F F F G L L gggaccagtacagtattt G T S T V F	Signal- sequenz
gcagatgattctgaaggatggcagtttgtccaagaaaacgga A D D S E G W Q F V Q E N G agaacctactacaaaaaggggacctcaaagaaacctactggcgagtgattgatggtaag R T Y Y K K G D L K E T Y W R V I D G K tactattatTTTgattctctatctggagagatggttgcggctggcaatatatcccgTTT Y Y Y F D S L S G E M V V G W Q Y I P F ccatctaaaggtagtacaattggtccttaccctaaatggtatcagattagaaggTTTtcca P S K G S T I G P Y P N G I R L E G F P aagtcagagtggtagtacttgcataaaaatggagtgcataagagTTTgttggTTggaaa K S E W Y Y F D K N G V L Q E F V G W K acattagagattaaaaactaaagacagtgttggaaagaaagtaggggaaaaacgtgaagat T L E I K T K D S V G R K Y G E K R E D tcagaagataaagaagagaagcgttattatacgaactattactTTtaatacaaaatcattct S E D K E E K R Y Y T N Y Y F N Q N H S ttagag L E	N-terminaler Bereich
acaggTTggctTTtatgatcagTctaactggTattatctagctaagacggaaattaatgga T G W L Y D Q S N W Y Y L A K T E I N G gaaaactacTTgTgTgTgaaagcgt E N Y L G G E R R gcgggTgggataaaacgatgattcgacttggTactacctagatccaacaactggTattatgcaa A G W I N D D S T W Y Y L D P T T G I M Q acaggTTggcaatatctaggttaataagTggTactacctcgTTcctcaggagcaatggcc T G W Q Y L G N K W Y Y L R S S G A M A actggctggtatcaggaaggtaccacttggTattatTTtagaccacccaaatggcgatatgaaa T G W Y Q E G T T W Y Y L D H P N G D M K acaggTTggcaaaacCTTgggaacaaatggTactatctccgTTcatcaggagctatggca T G W Q N L G N K W Y Y L R S S G A M A actggttggTatcaagatggttcaacttggTactacctaataatgcaggtaatggagacatgaag T G W Y Q D G S T W Y Y L N A G N G D M K acaggTTggtccaggTcaatggcaactggTactatgcttatagctcaggTgctTTggca T G W F Q V N G N W Y Y A Y S S G A L A	Repeat- Region
gtgaatacgaccgtagatggctattctgtcaactataatggcgaatgggTtcgg V N T T V D G Y S V N Y N G E W V R	C-terminaler Bereich

Abbildung 13E: DNA- und Proteinsequenz des offenen Leserasters im Genomabschnitt 4256-1, das für ein cholinbindendes Protein kodiert; CbpJ (Gosink *et al.*, 2000).

<p>atgaaaaagaaatctaactagtttagcacttgtaggcgcttttttaggtttgtcatggat M K K K L T S L A L V G A F L G L S W Y gggaatgttcaggc G N V Q A</p>	Signalsequenz
<p>tcaagaaagttcagga Q E S S G aataaaatccactttatcaatgttcaagaaggtggcagtgatgcgattattcttgaaagc N K I H F I N V Q E G G S D A I I L E S aatggacattttgccatggtggatacaggagaagattatgatttcccagatggaagtgat N G H F A M V D T G E D Y D F P D G S D tctcgctatccatggagagaaggaattgaaacgtcttataagcatgttctaacagaccgt S R Y P W R E G I E T S Y K H V L T D R gtctttcgctgtttgaaggaattgggtgtccaaaaacttgattttattttggtgacccat V F R R L K E L G V Q K L D F I L V T H accacagtgatcatattggaaatgttgatgaattactgtctacctatccagttgaccga T H S D H I G N V D E L L S T Y P V D R gtctatcttaagaaatatagtgatagtcgtattactaattctgaacgtctatgggataat V Y L K K Y S D S R I T N S E R L W D N ctgatatgctatgataaaggttttacagactgctgcagaaaaaggtgttcagttattcaa L Y G Y D K V L Q T A A E K G V S V I Q aatatcacacaagggatgctcattttcagtttggggacatggatattcagctctataat N I T Q G D A H F Q F G D M D I Q L Y N tatgaaaaatgaaactgattcatcggtgaattaaagaaaaattgggatgacaattccaat Y E N E T D S S G E L K K I W D D N S N tccttgatttagcgtggtgaaagtcaatggcaagaaaaattaccttggggcgatttagat S L I S V V K V N G K K I Y L G G D L D aatgttcatggagcagaagacaagtatggtcctctcattggaaaagttgatttgatgaag N V H G A E D K Y G P L I G K V D L M K tttaatcatcaccatgataccaacaatcaataccaaggatttcattaaaaatttgagt F N H H H D T N K S N T K D F I K N L S ccgagtttgattgttcaaaccttcggatagctctaccttggaaaaatggtgttgatagtgag P S L I V Q T S D S L P W K N G V D S E tatgttaattggctcaaagaacgaggaattgagagaatcaacgcagccagcaaaagactat Y V N W L K E R G I E R I N A A S K D Y gatgcaacagttttgatattcgaaaagacggtttgtcaatatttcaacatcctacaag D A T V F D I R K D G F V N I S T S Y K ccgattccaagttttcaa P I P S F Q</p>	N-terminaler Bereich
<p>gctggttggcataagagtgcatatgggaactggtggtatcaagcgcctgattctacaggagagtatgct A G W H K S A Y G N W W Y Q A P D S T G E Y A gtcgttgggaatgaaatcgaaggtgaattggtattactttaaccaaacgggtatcttggttacag V G W N E I E G E W Y Y F N Q T G I L L Q aatcaatggaaaaaatggaacaatcattggttctatttgacagactctggtgcttctgct N Q W K K W N N H W F Y L T D S G A S A aaaaattggaagaaatcgctggaatctggtattattttaacaaagaaaaccagatggaa K N W K K I A G I W Y Y F N K E N Q M E attggttggattcaagataaagagcagtggtattatttggatggttgatggttctatgaag I G W I Q D K E Q W Y Y L D V D G S M K acaggatggcttcaatatatggggcaatggtattactttgctccatcaggggaaatgaaa T G W L Q Y M G Q W Y Y F A P S G E M K atgggtggtgaaagataaagaaacctggtactatattggttctactggtgtcatgaag M G W V K D K E T W Y Y M D S T G V M K acaggtgagatagaagttgctggtcaacattattatctggaagattcaggagctatgaag T G E I E V A G Q H Y Y L E D S G A M K caaggctggcataaaaaaggcaaatgattggtattttctacaagacagacggttcacgagct Q G W H K K A N D W Y F Y K T D G S R A gtgggtggtatcaaggacaaggataaatggtacttcttgaaagaaaatggtcaattactt V G W I K D K D K W Y F L K E N G Q L L</p>	Repeat-Region
<p>gtgaacggtgaagacaccagaaggttatactgtggattcaagtggtgcctggttagtggtat V N G K T P E G Y T V D S S G A W L V D gtttcgatcgagaaatctgtacaattaaaactacaagtcattcagaaaaaaaagaatcc V S I E K S A T I K T T S H S E I K E S aaagaagtagtgaaaaaggatcttgaaaaataaagaaacgagtcacatgaaagtgttaca K E V V K K D L E N K E T S Q H E S V T aatttttcaactagtcaagatttgacatcctcaacttcacaaagctctgaaacgagtgta N F S T S Q D L T S S T S Q S S E T S V aacaatcggaatcagaacagtag N K S E S E Q -</p>	C-terminaler Bereich

Abbildung 13F: DNA- und Proteinsequenz des offenen Leserasters im Genomabschnitt 4139, das Homologien zur Repeatstruktur von SpsA aufweist und für ein cholinbindendes Protein kodiert; CbpE (Gosink *et al.*, 2000).

Das im Genomabschnitt 4139 gefundene cholinbindende Protein ist mit 627 Aminosäuren, einem berechneten Molekulargewicht von 72,0 kDa und 10 cholinbindenden Repeats das größte Protein nach PspA und SpsA. Als mögliche Signalsequenz konnte der Bereich von Aminosäure 1 bis 25 identifiziert werden (*Abbildung 13F*). Die Suche nach Sequenzhomologien des N-terminalen Bereichs in den Proteindatenbanken ergab keine Übereinstimmung mit bekannten Proteinen.

4.1.3 Klonierung des cholinbindenden Proteins P4139

Von den im Genom gefundenen cholinbindenden Proteinen weist das Protein des Genomabschnitts 4139 neben PspA und SpsA die höchste Anzahl an cholinbindenden Repeats auf. Weiterhin ist es mit 622 Aminosäuren deutlich größer als die anderen Proteine und die nähere Charakterisierung dieses cholinbindenden Proteins stellte einen vielversprechenden Ansatz zur Identifizierung eines neuen potentiellen Virulenzfaktors dar.

Der dem N-terminalen Bereich des Proteins - von Aminosäure 26 bis 336 - entsprechende Abschnitt wurde in der PCR amplifiziert, in den Expressionsvektor pQE-30 ligiert und in *E. coli* transformiert. Es erfolgte eine Überexpression eines ca. 38 kDa Proteins, das im Western-Blot eine sehr schwache Reaktion mit humanem Fibrinogen und humanem IgG zeigte. Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern erfolgte zunächst eine Proteinaufreinigung. Die Herstellung der Antikörper gegen das aufgereinigte Protein erfolgte anschließend bei der Firma Eurogentech. Die Pneumokokkenstämme unserer Stammsammlung wurden im Immunoblot auf Bindung der gegen das Protein P4139 gerichteten Antikörper untersucht. Von den 50 getesteten Stämmen zeigten 8 eine Reaktion mit dem Antiserum, wobei zwei Fragmente mit einer Größe von ca. 50 kDa und ca. 35 kDa identifiziert werden konnten. Daß es sich bei dem Protein P4139 um ein Oberflächenprotein handelt, konnte in der Immunfluoreszenz-mikroskopie gezeigt werden.

4.2 Charakterisierung der Bindung von humanem Lactoferrin an *Streptococcus pneumoniae*

4.2.1 Untersuchungen zur Bindung von humanem Lactoferrin an *S. pneumoniae* verschiedener Serotypen

Diese Untersuchung diente zur Bestimmung der unterschiedlichen Bindungseigenschaften des Lactoferrin-bindenden Proteins bei Pneumokokken an humanes Lactoferrin (hLf) und Evaluierung eventueller prozentualer Unterschiede in der Bindung zwischen Blutisolaten und Isolaten aus dem Nasopharynx. Diese Einteilung wurde gewählt, da Lactoferrin in der Mukosa in 100-fach höherer Konzentration als im Serum vorkommt.

Die Bindung von humanem Lactoferrin an verschiedene *S. pneumoniae* wurde im Bindungsversuch mit radioaktiv-markiertem, löslichem Lactoferrin untersucht. Neben den definierten Stämmen aus den Stammsammlungen - ATCC und NCTC - wurden vor allem klinische Isolate, die vom Statens Serum Institut in Kopenhagen, Dänemark, sowie vom Institut für Medizinische Mikrobiologie in Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden, getestet. Hierbei handelte es sich um 24 verschiedene Serotypen. Die Messung des gebundenen radioaktiv markierten Lactoferrins erfolgte nach Inkubation der Bakterien mit 23 - 37 nCi (50000 - 80000 Signale pro Minute (cpm)) ^{125}I -humanem Lactoferrin und anschließender Präzipitation der Bakterien. Um das Abzentrifugieren der Pneumokokken zu vereinfachen, wurde bei der Präzipitation ein weiterer Stamm - *Staphylococcus warneri* (DSM20036) - hinzugefügt. In vorausgegangenen Tests wurde für diesen *Staphylococcus*-Stamm keine Bindungsaktivität für Lactoferrin gemessen (*Abb. 4*).

Von den 63 getesteten *S. pneumoniae*-Stämmen zeigten 59 (94%) eine Bindung an humanes Lactoferrin - eine Bindung weniger als 5% wurde als Hintergrundaktivität gewertet und wurde bei 4 getesteten Stämmen beobachtet. Die Bindung lag im Bereich von ca. 3 - 62% (*Tabelle 6, Abbildung 14*). Die hier angegebene Standardabweichung bezieht sich auf die Anzahl der Stämme gleichen Serotyps. Die einzelnen Werte für einen Stamm wurden mindestens dreimal bestimmt, um eventuelle Unterschiede aufgrund verschiedener Wachstumsbedingungen auszuschließen.

Tabelle 6: Bindung von ¹²⁵I-hLf an 24 verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae* (die Bindung ist in Prozent [%] bezüglich der eingesetzten Gesamtaktivität angegeben).

Serotyp	Anzahl	Bindung in %
1	10	26.5 ± 10.4 ^a
2	1	31.8
3	5	42.1 ± 12.7
4	3	25.5 ± 6.7
4L	1	34.8
6A	3	8.2 ± 3.7
6B	4	8.9 ± 0.54
7F	4	35.6 ± 19.2
8	2	5.6 ± 1.8
9A	1	17.8
9V	2	47.5 ± 0.65
10A	1	21.3
11A	1	37.1
12F	2	15 ± 10.7
14	7	26.7 ± 10
18B	2	39.1 ± 10.1
18C	1	20.1
18F	2	17.2 ± 4.1
19F	4	41.2 ± 21.1
23A	2	36.4 ± 2.1
23F	2	30.5 ± 9.8
24F	1	54.1
33F	1	2.9
35A	1	48.7

^a Standardabweichung

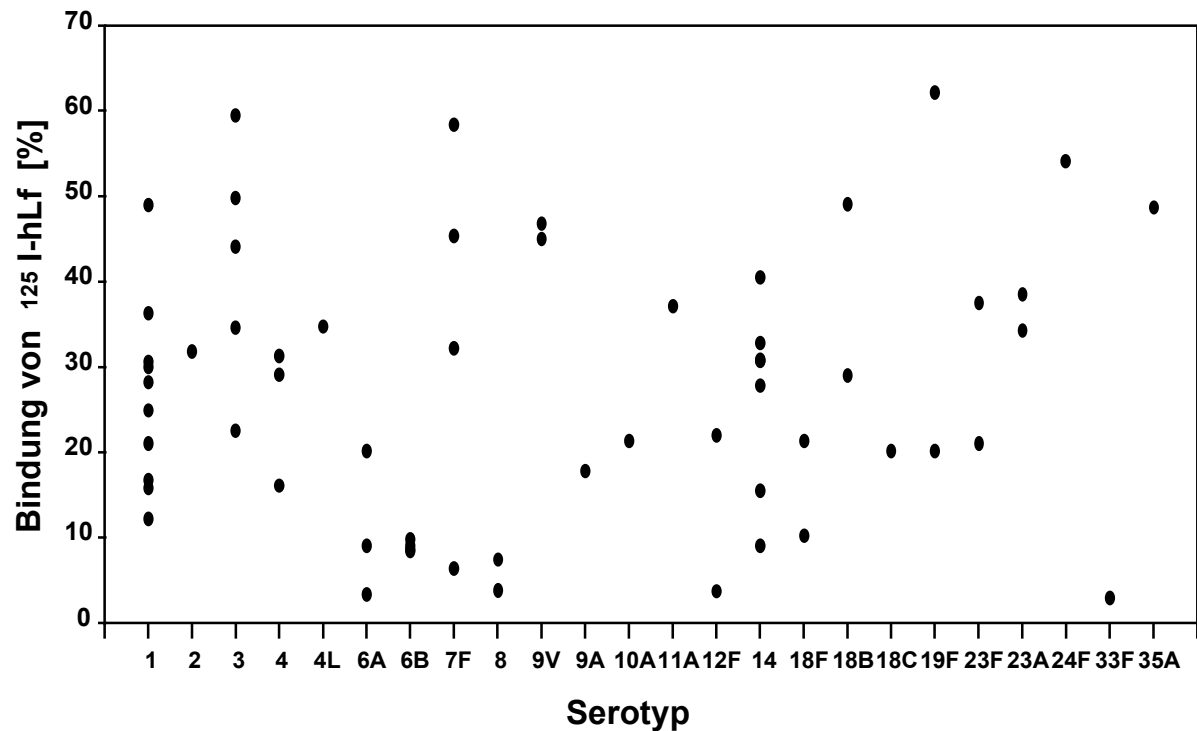


Abbildung 14: Bindung von ¹²⁵I-hLf an verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae*. Ein Punkt entspricht einem Stamm. Werte sind Mittelwerte von dreifach-Bestimmungen.

Eine Abhängigkeit zwischen der Lactoferrin-Bindungsaktivität und dem Serotyp war nicht zu erkennen. Mehrere Isolate des gleichen Serotyps wiesen zum Teil Bindungsunterschiede von bis zu 20 % auf (Serotyp 7F und 19 F).

4.2.2 Western-Blot Analyse der Lactoferrin-Bindung an *S. pneumoniae*

Die Bindung von hLf, sowie von radioaktiv-markiertem Lactoferrin an Pneumokokken der unterschiedlichen Serotypen wurde ebenfalls im Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die verschiedenen Serotypen zum Teil unterschiedliche Bindungsmuster der für die Bindung beteiligten Proteine aufwiesen. Das Molekulargewicht der mit Lactoferrin interagierenden Proteine lag zwischen 65 kDa und 90 kDa (*Abbildung 15*).

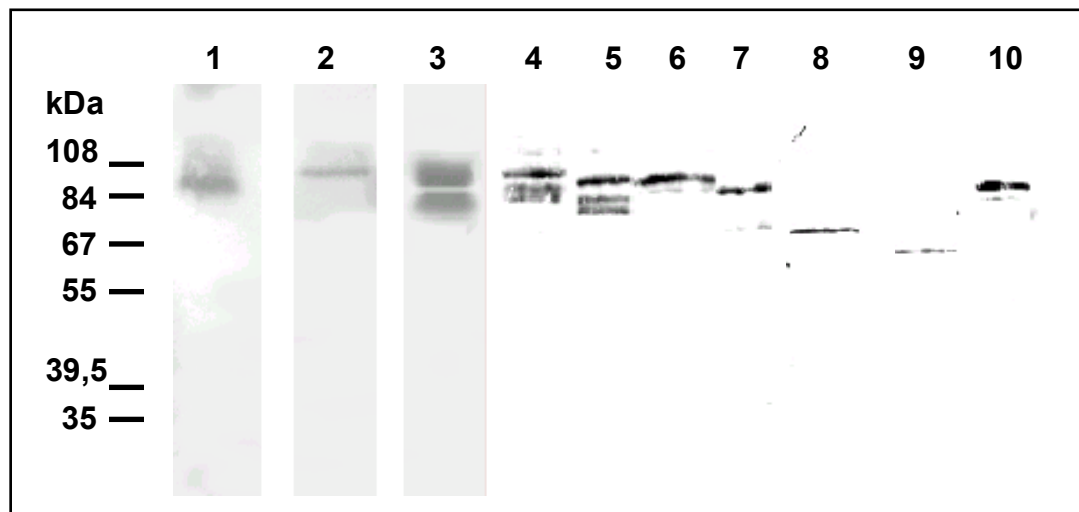


Abbildung 15: Bindung von humanem Lactoferrin an Pneumokokkenstämme unterschiedlichen Serotyps. 1: Sp78; 2: Sp95; 3: Sp21; 4: Sp105; 5: Sp109; 6: Sp99; 7: Sp36; 8: Sp100; 9: Sp101; 10: Sp102. Position 1-3: Bindung von ¹²⁵I-hLf. Position 4-10: Bindung von hLf und anti-hLf-POD als Sekundärantikörper.

4.2.3 Bestimmung der Spezies-Spezifität der Lactoferrin-Bindung

Pneumokokken sind ausschließlich humanpathogene Erreger. Mit der Bestimmung der Spezies-Spezifität der Lf-Bindung sollte überprüft werden, ob sich diese Spezifität der Pneumokokken auch in der Bindung von Lf unterschiedlicher Säugetiere zeigt. Es wurde untersucht, ob Pneumokokken neben dem humanen Lactoferrin bovines Lactoferrin binden können. Hierzu wurden humanes und bovines Lactoferrin radioaktiv markiert und die Bindung an verschiedene Pneumokokken wurde im Immunoblot untersucht. Hierbei ergab sich keine Bindung des radioaktiven bovines Lactoferrins. Ebenfalls konnte die Bindung von

humanem Lactoferrin nicht durch die Zugabe von bovinem Lactoferrin inhibiert werden. Die Ergebnisse zeigten, daß die Bindung von Lactoferrin an Pneumokokken human-spezifisch ist.

4.2.4 Untersuchung der Bindungsaffinität von Lactoferrin an *S. pneumoniae*

In kinetischen, radioaktiven Bindungsstudien wurde untersucht, ob eine Absättigung der Lactoferrin-Bindungsstellen durch die Zugabe steigender Konzentrationen von nicht-markiertem Lactoferrin erreicht werden konnte. Hierzu wurde der *S. pneumoniae*-Stamm NCTC 7978 - Serotyp 3 - ausgewählt, der eine 50%ige Bindung an Lactoferrin im Bindungsversuch (Abb.14) und eine spezifische Bindung bei 84 kDa in der Western-Blot Analyse zeigte (Abb.15).

Die Untersuchung der Bindungsaffinität erfolgte mit 37 nCi (80000 cpm) ^{125}I -hLf pro Reaktion - dieser Wert entsprach 19 ng an radioaktiv-markiertem hLf. An nicht-markiertem Lf wurden in steigender Konzentration 0,6 ng bis 200 μg eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten eine hyperbolische Beziehung zwischen gebundenem und freiem Lactoferrin (Abbildung 16), die einer Protein-Protein-Interaktion entspricht.

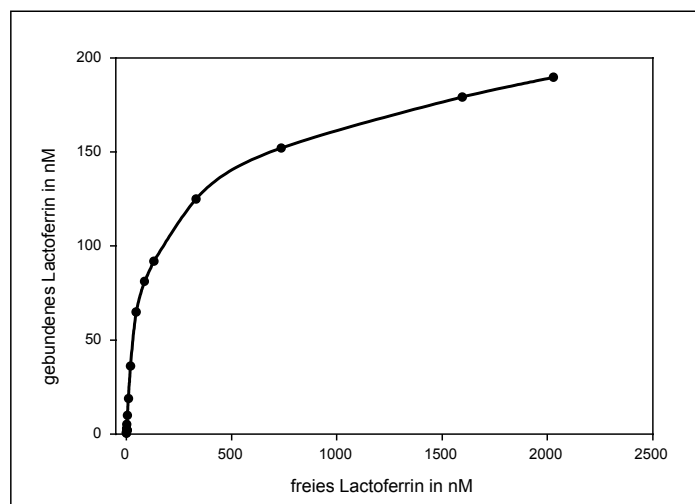


Abbildung 16: Sättigungskurve der ^{125}I -Lactoferrin-Bindung an NCTC 7989 (Serotyp 3).

Im Versuch konnte die Bindung von markiertem Lactoferrin durch die Zugabe von nicht-markiertem hLf nahezu vollständig inhibiert werden. Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten erfolgte eine Analyse nach Scatchard (Scatchard, 1949). Hierzu wurden die Konzentrationen an gebundenem und freiem Lf der radioaktiven Bindungsstudie berechnet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Berechnung der Menge an freiem und gebundenem humanen Lactoferrin (hLf) für die Darstellung nach Scatchard.

¹²⁵ I-hLf (ng)	nicht- markiertes hLf (ng)	Stoffmengenkon- zentration - gesamt hLf (nM)	Stoffmengenkon- zentration - gebundenes hLf (nM)	Stoffmengenkon- zentration - freies hLf (nM)	gebundenes hLf/ freies hLf
38	-	0,84	0,57	0,27	2,13
38	19,5	1,28	0,87	0,41	2,15
38	39,1	1,71	1,17	0,54	2,18
38	78,1	2,57	1,73	0,84	2,06
38	156,3	4,31	2,89	1,42	2,03
38	312,5	7,71	5,20	2,52	2,07
38	625	14,70	9,89	4,81	2,05
38	1,25 x 10 ³	28,56	18,82	9,74	1,93
38	2,50 x 10 ³	56,28	36,14	20,14	1,79
38	5,00 x 10 ³	111,71	64,87	46,84	1,35
38	7,50 x 10 ³	167,14	81,09	86,05	0,94
38	10,00 x 10 ³	222,57	91,92	130,65	0,70
38	20,00 x 10 ³	444,30	113,00	331,30	0,34
38	40,00 x 10 ³	887,76	152,11	735,65	0,21
38	80,00 x 10 ³	1774,68	179,27	1595,41	0,11
38	100,00 x 10 ³	2218,14	189,74	2028,40	0,09

Die Darstellung nach Scatchard ergab zwei lineare Graphen (*Abbildung 17*).

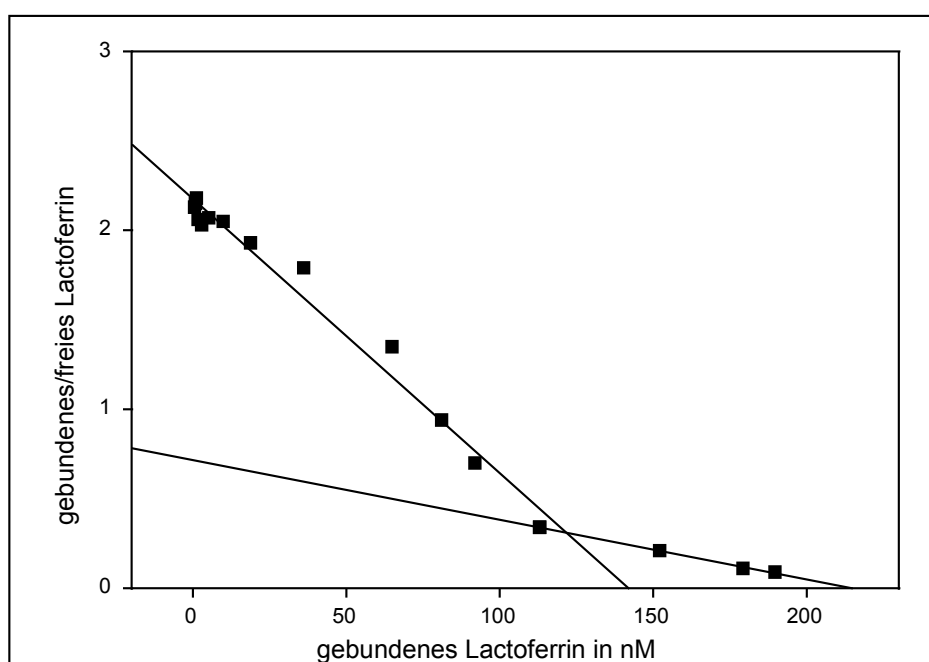


Abbildung 17: Darstellung der Lactoferrin-Bindung an *S. pneumoniae* nach Scatchard.

Das Ergebnis der Scatchard-Analyse ist typisch für eine Interaktion eines Proteins mit zwei unterschiedlichen Rezeptoren auf der bakteriellen Oberfläche. Die eine Bindungsstelle weist eine Bindungskonstante von $4,5 \times 10^{-8}$ M und die zweite eine Konstante von $2,6 \times 10^{-7}$ M auf. Somit weist eine Lactoferrin-Bindungsstelle eine höhere Bindungskonstante auf.

4.2.5 Kompetitive Inhibition der Lactoferrin-Bindung durch PspA

Bereits in dem Ergebnisteil 4.1.1.5 konnte gezeigt werden, daß PspA an der Bindung von humanem Lactoferrin an *S. pneumoniae* beteiligt ist. In der Literatur war für PspA bisher keine Funktion beschrieben worden.

Zur Eingrenzung der Bindungsdomäne von hLf an Pneumokokken wurde zunächst die Bindung von aufgereinigten His-tag-Fusionsproteinen von PspA an humanes Lactoferrin in einer Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 18). Das Fusionsproteine QP1 beinhaltete den N-terminalen Bereich von PspA von Aminosäure 32 bis 402. Dieses entsprach PspA ohne Signalsequenz bis einschließlich der Prolin-reichen Region. Das Fusionsprotein QP2 beinhaltete den N-terminalen Bereich von PspA von Aminosäure 32 bis 319 und entsprach somit dem Protein QP1 ohne Prolin-reiche Region (Abb 22.). Der C-terminale Bereich von PspA wurde nicht untersucht, da dieser nahezu identisch zu SpsA ist und SpsA kein Lactoferrin band.

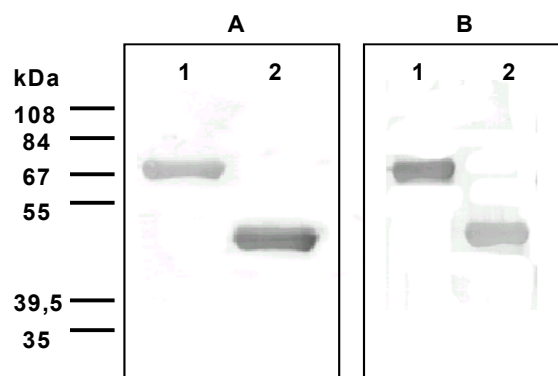


Abbildung 18: Western-Blot Analyse von QP1 (PspA von Aminosäure 32 bis 402; Spur 1) und QP2 (PspA von Aminosäure 32 bis 319; Spur 2). **A:** Bindung von hLf. **B:** Bindung von anti-PspA.

Das Ergebnis der Western-Blot Analyse zeigte, daß beide Fusionsproteine, QP1 und QP2, humanes Lactoferrin banden (Abb. 18A). Daher ist die Bindungsdomäne von PspA im N-terminalen Bereich von Aminosäure 32 bis 319 und nicht in der Prolin-reichen Region lokalisiert.

Anschließend sollte geklärt werden, ob hauptsächlich PspA für die Bindung von hLf an Pneumokokken verantwortlich ist. Für die Untersuchung der kompetitiven Hemmung der Bindung von Lactoferrin an Pneumokokken durch die Zugabe von aufgereinigtem PspA

wurde das His-tag-Fusionsprotein QP2 verwendet. Für den Bindungsversuch wurden 39 nCi (86000 cpm) an ^{125}I -hLf pro Ansatz eingesetzt - dieses entsprach 24 ng hLf. Die Konzentrationen von eingesetztem Protein reichten von 19,5 ng bis 25 μg (Abb. 19).

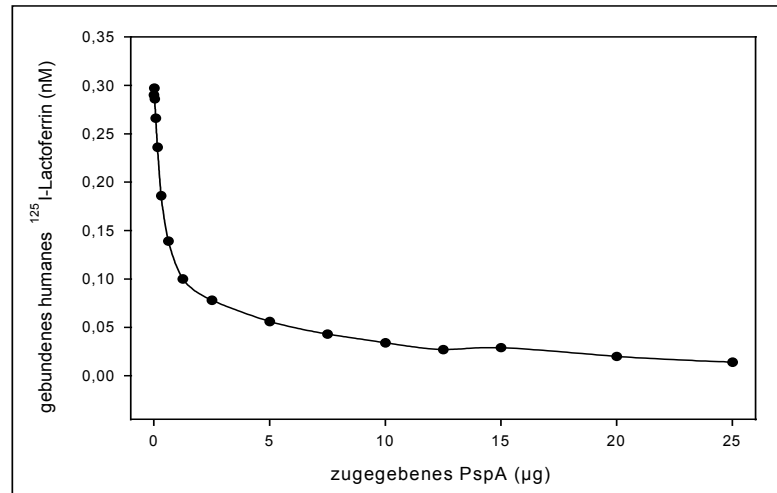


Abbildung 19: Kompetitive Inhibition der Bindung von hLf an *S. pneumoniae* NCTC 7978 (Serotyp 3) durch die Zugabe von 19,5 ng bis 25 μg an aufgereinigtem QP2 (Aminosäure 32 - 319 von PspA).

Die Ergebnisse zeigten, daß ab einer Zugabe von 2,5 μg PspA die Bindung von Lactoferrin an *S. pneumoniae* (NTCT 7978, Serotyp 3) fast vollständig kompetitiv inhibiert werden konnte, während bei geringeren Konzentrationen von PspA die Bindung von hLf linear abnahm.

4.2.6 Bestimmung der Bindungsdomäne bei PspA für humanes Lactoferrin

Zur Eingrenzung der funktionellen Lactoferrin-Bindungsdomäne von PspA bei *S. pneumoniae* wurde zunächst die Technik der sogenannten ‘SPOT-Synthese’ (Frank, 1992) angewendet. Hierbei wurde der N-terminale Bereich von Aminosäure 33 bis 402 (blauer und gelber Bereich in der Abbildung 22) in synthetische Peptide von 15 Aminosäuren unterteilt und auf einer Membran immobilisiert. Das Leseraster verschob sich von Peptid zu Peptid um 3 Aminosäuren, so daß 12 Aminosäuren von Peptid zu Peptid identisch blieben. Diese Membran wurde anschließend mit humanem Lactoferrin und anti-hLf als sekundären Antikörper inkubiert. Eine unspezifische Reaktion durch den anti-hLf-Antikörper wurde vorher ausgeschlossen, indem die Membran nur mit diesem Antikörper inkubiert wurde und keine Bindung detektiert werden konnte. Die mit humanem Lactoferrin und anti-hLf-Antikörpern behandelte ‘SPOT-Membran’ ist in Abbildung 20 dargestellt.

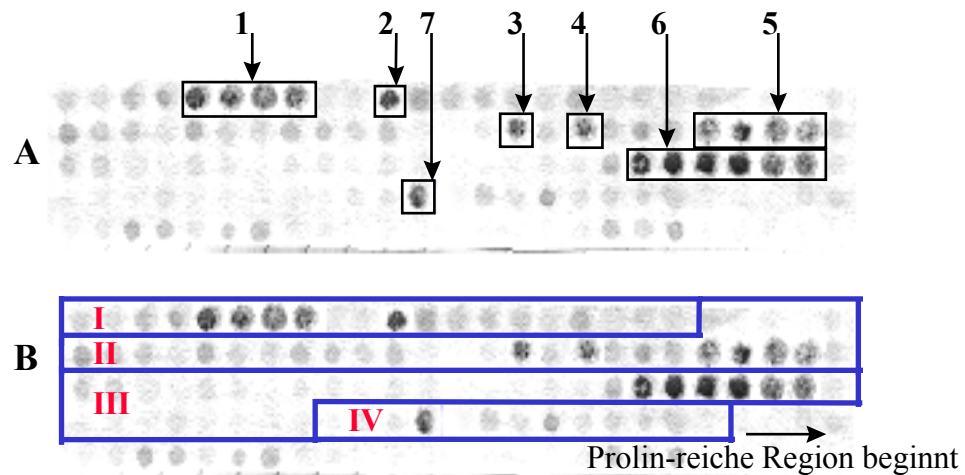


Abbildung 20: SPOT-Membran von PspA (Aminosäure 32 bis 402), entwickelt mit hLf und anti-hLf-POD. **A:** die Kästchen 1 - 7 markieren die 15er Peptide, die eine starke Bindung aufwiesen. **B:** die Abschnitte I - IV markieren die 4 Bereiche, die für die Eingrenzung der Lactoferrin-Bindungsdomäne ausgewählt wurden.

Die Analyse der SPOT-Membran zeigte 7 Bereiche, die eine mögliche Bindungsdomäne für hLf darstellen könnten. Ein Vergleich dieser Abschnitte ergab, daß bei allen ein hoher Anteil der Aminosäuren 'Lysin' und eine Kombination mit 'Alanin' enthalten ist. In der *Abbildung 21* sind die Aminosäuresequenzen der 15er Peptide, die in einzelnen Bereichen reagiert haben, sowie deren mögliche Konsensus-Sequenzen aufgelistet.

Bereiche der hLf-Bindung

mögliche Konsensus-Sequenzen

1 KDYDAAKKDAKNAKK	AK--AK	
DAAKKDAKNAKKAVE	AK--AK	AKKA
KKDAKNAKKAVEDAQ	AK--AK	AKKA
AKNAKKAVEDAQKAL	AK-AK	AKKA
2 DAQKALDDAKAAQKK	K---AK	
3 VVPEPEQLAETKKKS	KKK--A	
4 QLAETKKKSEEAKQK	K---AK	
5 KQKAPELTKKLEEA	K---AK	
APELTKKLEEA	K---AK	
LTKKLEEA	K---AK	
KLEEA	K---AK	
6 KEGFRAPLYSKLDAK	K--AK	
FRAPLYSKLDAKKAK	K--AK	AKKA
PLYSKLDAKKAKLSK	K---AK	AKKA
SKLDAKKAKLSKLEE	K---AK	AKKA
DAKKAKLSKLEELSD	K---AK, K-AK	AKKA
KAKLSKLEELSDKID	K---AK	
7 YFKEGLEKTIAAKKA	K---AK	AKKA

Abbildung 21: Aminosäuresequenzen der 15er Peptide, die mit hLf und anti-hLf-POD als Sekundärantikörper eine Reaktion zeigten, sowie deren mögliche Konsensus-Sequenzen.

Die Übersicht über die möglichen Konsensus-Sequenzen der hLf-Bindung ergab bei allen Bereichen (außer 3) die Aminosäurefolge 'K-(-)(-)AK'. Im weiteren Verlauf sollte nun geklärt werden, ob alle Bereiche für die hLf-Bindung von PspA notwendig sind oder einige der bisher identifizierten Bereiche aufgrund der Aminosäureabfolge das hLf unspezifisch banden. Zur näheren Eingrenzung der Bindungsdomäne für humanes Lactoferrin an Pneumokokken wurde der N-terminale Teil von PspA anhand des Ergebnisses der 'SPOT-Membran' in 4 Domänen (*Abb. 20, I - IV*) eingeteilt. Die Domäne **I** umfaßte die Peptide der Bereiche 1 und 2 (*Abb. 20A*), die Domäne **II** die Peptide der Bereiche von 3 bis 5 (*Abb. 20A*), die Domäne **III** die Peptide des Bereichs 6 und die Domäne **IV** den Bereich 7. Diese Domänen wurden mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert (*Abb. 22*).

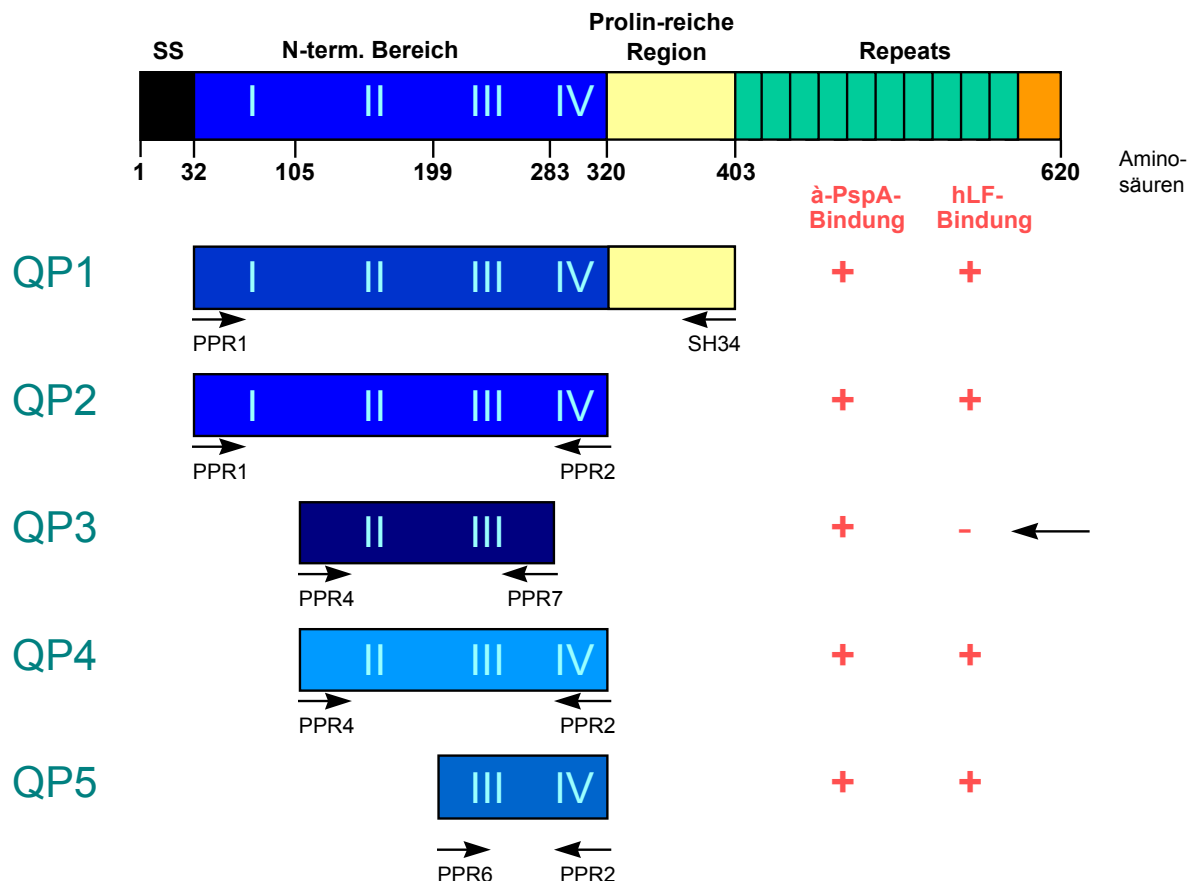


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Expression verschiedener rekombinanter Proteine von PspA (Stamm NCTC 7978). Die einzelnen Fragmente wurden mit den jeweiligen Oligonukleotidprimern (PPR1 bis PPR7, SH34) PCR-amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE-30 (QIAGEN) 'in-frame'-kloniert. Diese Fragmente wurden als His-tag-Fusionsproteine, resultierend in QP1 bis QP5, exprimiert. Die Bereiche I bis IV geben die vier Bereiche in PspA an, die mittels der SPOT-Membrananalyse als mögliche Lactoferrin-Bindungsgebiete identifiziert wurden. In rot dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blot Analysen von QP1 bis QP5 mit anti-PspA-Antikörper (anti-QP2) und humanem Lactoferrin (hLf).

Folgende Teilbereiche von PspA wurden als His-tag-Fusionsproteine überexprimiert i) QP1: Aminosäure 32 - 402, ii) QP2: Aminosäure 32 - 319, iii) QP3: Aminosäure 105 - 282, iv) QP4: Aminosäure 105 - 319 und v) QP5: Aminosäure 199 - 319 (*Abb. 22*). Die einzelnen Fusionsproteine wurden aufgereinigt und die Bindung von humanem Lactoferrin sowie von anti-PspA-Antikörpern wurde überprüft (*Abbildung 23*).

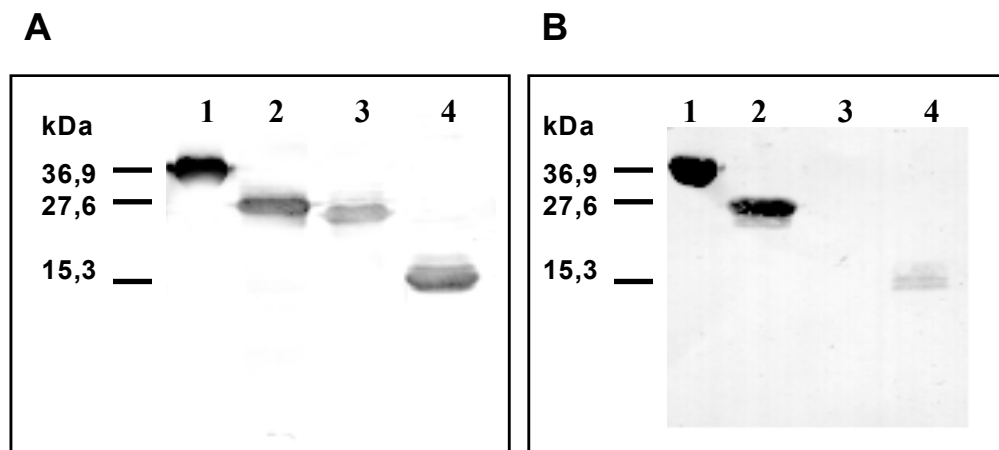


Abbildung 23: Western-Blot Analyse der rekombinanten PspA-Proteinen QP2 (Aminosäure 32 -402), QP3 (Aminosäure 105 -282), QP4 (Aminosäure 105 - 319) und QP5 (Aminosäure 199 - 319). **A:** Bindung von anti-PspA-Antiserum (anti-QP2). **B:** Bindung von hLf und anti-hLf. 1: QP2; 2: QP4; 3: QP3 und 4: QP5.

Alle rekombinanten Proteine reagierten mit anti-PspA-Antikörper und bis auf QP3 reagierten auch alle Proteine mit humanem Lactoferrin. QP3 entspricht dem um die Domäne **IV** verkürzten Protein QP4 und da es kein hLf band, muß mindestens eine Bindungsdomäne für hLf von Aminosäure 283 bis 319 lokalisiert sein (siehe *Abb. 22* und *23*).

In dem Bereich **IV** hatte auf der SPOT-Membran nur ein einzelnes 15er Peptid mit hLf und anti-hLf-POD reagiert (*Abb. 20*, A7). Die Sequenz dieses 15er Peptids lautete 'YFKEGLEKTIAAKKA'. Die Ergebnisse der Bindungsanalysen von humanem Lactoferrin an rekombinante Proteine von PspA lassen demnach auf nur ein Bindungsmotiv in PspA im Bereich von Aminosäure 291 bis 305 schließen.

Anschließend sollte untersucht werden, ob sich das Bindungsmotiv 'YFKEGLEKTIAAKKA' weiter eingrenzen ließ. Dieses sollte unter Berücksichtigung der möglichen Konsensussequenz der hLf-Bindung 'K-(-)(-)AK' (*Abb. 21*) erfolgen. Hierzu wurden zunächst die Aminosäuren Lysin und Alanin zu 8er Peptiden auf eine SPOT-Membran synthetisiert. Jedes Peptid bestand aus einer unterschiedlicher Anzahl und Reihenfolge an Lysin (K) und Alanin (A) in 256 möglichen Kombinationen. Die Membran wurde mit hLf und anti-hLf-POD als Sekundärantikörper inkubiert. Die Analyse der SPOT-Membran zeigte

kein Bindungsmotiv, daß sich aufgrund einer bestimmten Kombination von Lysin und Alanin ergab (*Abb. 24*).

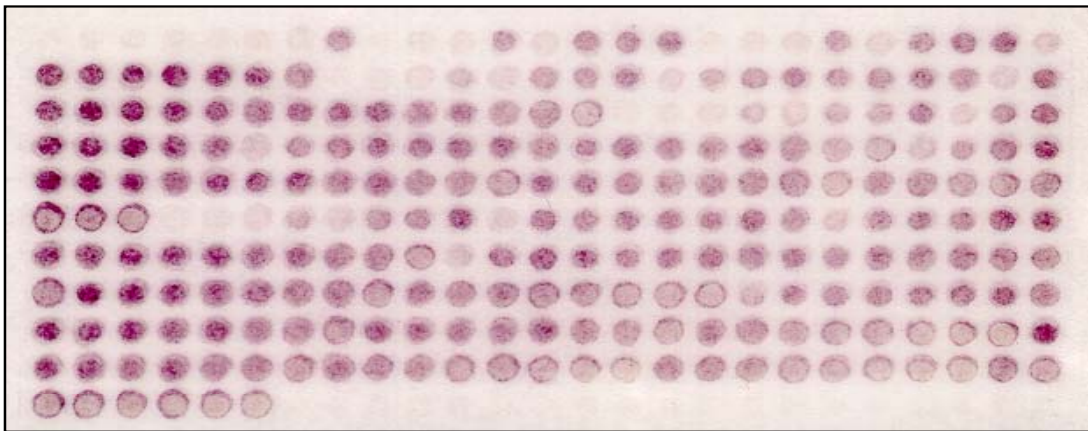


Abbildung 24: SPOT-Membran der 'AK-Motive'. Kombination der Aminosäuren Lysin (K) und Alanin (A) in verschiedener Anzahl und Reihenfolge zu 8er Peptiden (Aminosäuresequenz der einzelnen Peptide siehe Anhang 7J). Entwicklung der SPOT-Membran erfolgte mit hLf und anti-hLf-POD.

Das Ergebnis der SPOT-Membran war, daß bei der Kombinationen von Lysin und Alanin zu 8er Peptiden eine unspezifische Bindung von hLf auftrat. Um den Einfluß der Lysine auf die Lactoferrin-Bindung zu untersuchen, wurde in den 8er Peptiden einer weiteren SPOT-Membran die Aminosäure Alanin gegen alle anderen Aminosäuren ausgetauscht. Die Membran wurde mit hLf und anti-hLf-POD inkubiert. Die Analyse der SPOT-Membran zeigte, daß die Kombination von Lysin mit anderen Aminosäuren außer Alanin ebenfalls zu einer unspezifischen Bindung von hLf führte (*Abb. 25*).

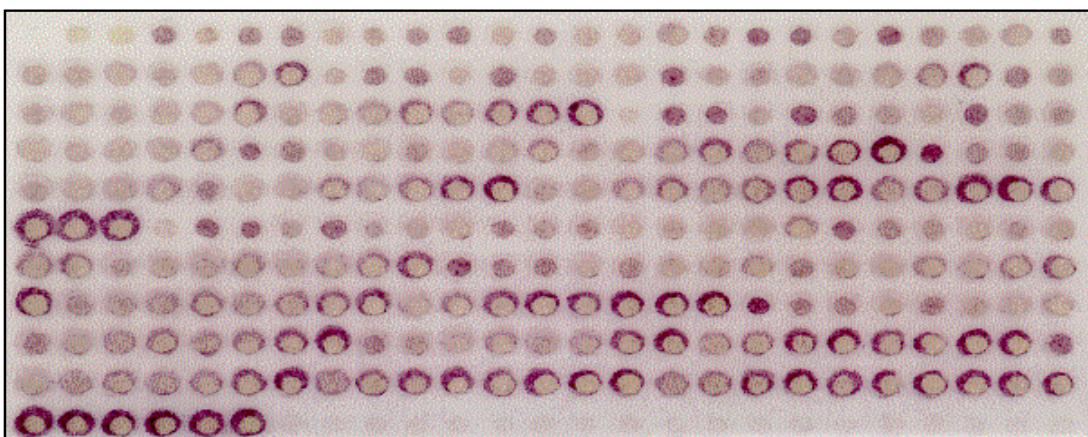


Abbildung 25: SPOT-Membran der 'ZK-Motive'. Kombination der Aminosäure Lysin (K) mit allen Aminosäuren außer Alanin (Z) in verschiedener Anzahl und Reihenfolge zu 8er Peptiden. Entwicklung der SPOT-Membran erfolgte mit hLf und anti-hLf-POD.

In der Sequenz von PspA konnte somit das 15er Peptid 'YFKEGLEKTIAAKKA' als minimales Bindungsmotiv charakterisiert werden.

4.2.7 Funktionelle Analyse der Bindung von humanem Lactoferrin an Pneumokokken

4.2.7.1 Überprüfung der spezifischen Proteininduktion beim Wachstum unter eisenlimitierenden und -substituierten Bedingungen

Bei dem Bakterienstamm *Neisseria gonorrhoeae* konnte gezeigt werden, daß dieser Stamm unter eisenlimitierenden Bedingungen eine Vielzahl von Membranproteinen, aber keine Siderophore synthetisierte (West und Sparling, 1985). Da ebenfalls bei *S. pneumoniae* keine Siderophore nachgewiesen werden konnten (Tai *et al.*, 1993), sollte unter eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen das sich eventuell verändernde Proteinexpressionsmuster untersucht werden. Um eisenlimitierende Wachstumsbedingungen zu erhalten, wurde dem Wachstumsmedium der Eisenchelator Ethylendiamindihydroxy-Essigsäure (EDDHA) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und die minimale EDDHA-Konzentration bestimmt, die zur Hemmung des Wachstums von NCTC 7978 (Serotyp 3) nötig war (2 mM). Für die Untersuchungen der Proteinexpressionsmuster wurde der Stamm zunächst in einem THY- und THY mit EDDHA-versetzten Wachstumsmedium kultiviert. Als Vergleich wurde der Stamm ebenfalls in dem THY-EDDHA-Medium substituiert mit verschiedenen Eisenquellen kultiviert. In einstündigen Intervallen wurden von den verschiedenen Kulturen 1 ml Proben entnommen, die Gesamtllysate der präzipitierten Pneumokokken in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt (Abb.26).

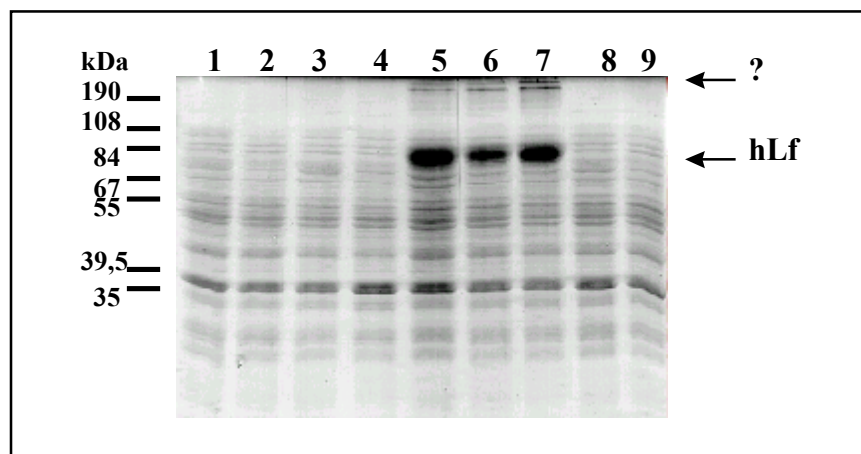


Abbildung 26: Proben der Wachstumsversuche von NCTC 7978 (Sp36) nach 6 Stunden Wachstum in verschiedenen Medien bei 37°C und 5% CO₂; Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels. 1: Sp36 in THY; 2: in THY + EDDHA (2 mM) ; 3: in THY + Hämin (8 µM); 4: in THY + Hämin (8 µM) + EDDHA (2 mM); 5: in THY + eisengesättigtes hLf (2,5 µM); 6: in THY + hLf (2,5 µM) + EDDHA (2 mM); 7: in THY + hLf (5 µM) + EDDHA (2 mM); 8: in THY + Hämoglobin (5 µM); 9: in THY + Hämoglobin (5 µM) + EDDHA (2 mM).

Der Stamm NCTC 7978 wies unter eisenlimitierenden (Abb. 26, Spur 2) und nach Substitution von Eisen durch die Zugabe von Hämin (Abb. 26, Spur 4) und Hämoglobin

(Abb. 26, Spur 9) kein erkennbares, verändertes Proteinexpressionsmuster auf. Bei den Wachstumskulturen mit dem eisengesättigtem humanen Lactoferrin sind Proteine - bei ca. 200 kDa und 80 kDa - zusätzlich zu beobachten bzw. sie sind bei diesen Kulturbedingungen überexprimiert (Abb. 26, Spur 5-7). Es wurde zunächst angenommen, daß es sich bei dem stark exprimierten 80 kDa-Protein um das induzierte PspA handelte, da bereits bekannt war, daß PspA hLf bindet. Dieses konnte in einer Western-Blot Analyse nicht bestätigt werden, da keine Reaktion mit anti-PspA-Antiserum (anti-QP1) erfolgte. Die Schlußfolgerung war, daß es sich bei diesem Protein um ein durch die Zugabe von Lactoferrin induziertes Protein handelte. Die N-terminale Sequenzierung blieb erfolglos, so daß das Fragment aus dem Coomassie-Gel isoliert wurde und die Sequenzierung interner Peptide erfolgte. Das Ergebnis zeigte, daß es sich bei diesem Protein um humanes Lactoferrin mit einem Molekulargewicht von 80 kDa handelte. Die Sequenz von humanem Lactoferrin sowie die sequenzierten Abschnitte (in rot) sind in *Abbildung 27* dargestellt.

```

MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRD
SPIQCIQAI AENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERQPRTHYYAVAVVKK
GGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPIEA A VARFFSASCVPG
ADKGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVA FIRESTVFEDLSD
EAERDEYELLCPDNTRKPVDFKFDCHLARVP SHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQEKFGK
DKSPKFQLFGSPSGQKDLLEFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFTAIQNLRKSEEEVAA
RRARVVWCAVGEQELRKC NQW SGLSEGSVTCSSASTTEDC IALVLKGEADAMSLDGGYVY
TAGKCGLPVLAENYKSQQSSDPDPNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCH
TAVDRTAGWNI PMGLLFNQ TGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPN
SNERYYG YTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKR
KPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAKFGRNGSDCPDKFCLFQSETKN
LLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLG PQYVAGITNLKKCSTSP LLEACEFLRK

```

Abbildung 27: Sequenz von humanem Lactoferrin (P02788 in der SwissProt-Datenbank). Rotmarkierte Bereiche geben die Aminosäurenabfolge der sequenzierten internen Peptide wieder.

Unter eisenlimitierenden und eisensubstituierten Wachstumsbedingungen konnte bei *S. pneumoniae* demnach keine Überexpression von Proteinen in einer Coomassie-Gelfärbung nachgewiesen werden. Die Detektion hoher Konzentrationen von Lactoferrin im Lysat der Pneumokokken, wies auf eine starke Protein-Protein-Interaktion von PspA und hLf hin.

4.2.7.2 Nutzung von humanem Lactoferrin als Eisenquelle beim Wachstum von *S. pneumoniae*

In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß Pneumokokken zum einen keine Siderophore bilden und zum anderen, daß Hämin als Eisenquelle zum Wachstum unter eisenlimitierenden Bedingungen verwendet werden kann (Tai *et al.*, 1993). Aufgrund der Dominanz von Pneumokokken im Respirationstrakt und dem Lactoferrin als Eisentransportprotein in mukösen Sekreten, wurde im Folgenden überprüft, ob *S. pneumoniae* ebenso eisengesättigtes humanes Lactoferrin als einzige Eisenquelle zum Wachstum verwenden kann. Zur Eisenlimitation des Wachstumsmediums wurde EDDHA zugesetzt. Es wurde die Konzentration gewählt, die gerade zur Hemmung des Wachstums der Pneumokokken ausreichte. Zu diesen Kulturen wurden verschiedene Konzentrationen eisengesättigtes humanes Lactoferrin gegeben. Der Wachstumsverlauf wurde mit Messung der OD bei 600nm verfolgt. Als Positivkontrolle wurde Hämin als Eisenquelle (nach Tai *et al.*, 1993) verwendet. Die Konzentration von Hämin betrug in allen Versuchen 8 μ M. Die optimale Konzentration von hLf wurde zunächst für ein Trachealisolat von *S. pneumoniae* (Sp129) bestimmt. Es wurden hLf-Konzentrationen von 5 μ M, 10 μ M und 50 μ M ausgewählt. Die Ergebnisse der Wachstumskurven sind in *Abbildung 28* dargestellt.

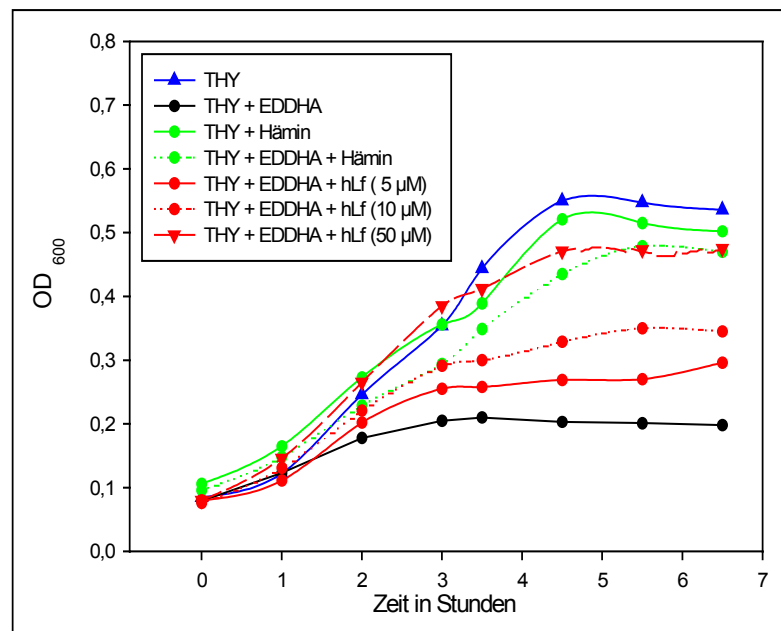


Abbildung 28: Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* Sp 129 (klinisches Trachealisolat aus Düsseldorf) unter eisenlimitierenden Bedingungen und bei Zusatz von Hämin und eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquellen. Die EDDHA-Konzentration betrug 200 μ M, die Hämin-Konzentration 8 μ M und die hLf-Konzentrationen 5 μ M, 10 μ M und 50 μ M. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

Die Wachstumskurve von Sp129 in THY wies einen typischen Kurvenverlauf mit lag-, log- und stationärer Phase auf. Die lag-Phase dauerte 30 bis 60 Minuten an, es folgte eine logarithmische Wachstumsphase für ca. 3 Stunden und anschließend war eine stationäre Phase zu beobachten, in der der Wachstumsversuch beendet wurde. Bei der Kultivierung von Sp129 im mit EDDHA-versetzten THY konnte nur in den ersten beiden Stunden ein geringes Wachstum beobachtet werden. Das Wachstum in THY mit 8 μM Hämin war vergleichbar mit dem in THY. Beim Zusatz von EDDHA zu THY und Hämin ist ein nur leicht vermindertes Wachstum gegenüber THY mit Hämin zu beobachten. Bei der Zugabe von eisengesättigtem humanen Lactoferrin in THY mit EDDHA ist eine konzentrationsabhängige Zunahme des Wachstums zu erkennen. Eine Konzentration von 50 μM hLf ist nötig, um den eisenlimitierenden Effekt des Eisenchelators vollständig auszugleichen. Der Kurvenverlauf mit 50 μM hLf entspricht dem in THY. Die Ergebnisse zeigten, daß *S. pneumoniae* (Sp129) humanes Lactoferrin als einzige Eisenquelle zum Wachstum nutzen konnte.

Für weitere Nasopharynxisolate konnte die Nutzung von humanem Lactoferrin als Eisenquelle bestätigt werden (Abb. 29 A und B). Bei dem Stamm Sp132 (siehe Anhang) wurden hLf-Konzentrationen von 5 μM , 10 μM und 50 μM untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls, daß 50 μM hLf benötigt wurden, um ein optimales Wachstum der Pneumokokken zu erhalten. Das Wachstumsverhalten entsprach dem in THY ohne Eisenentzug.

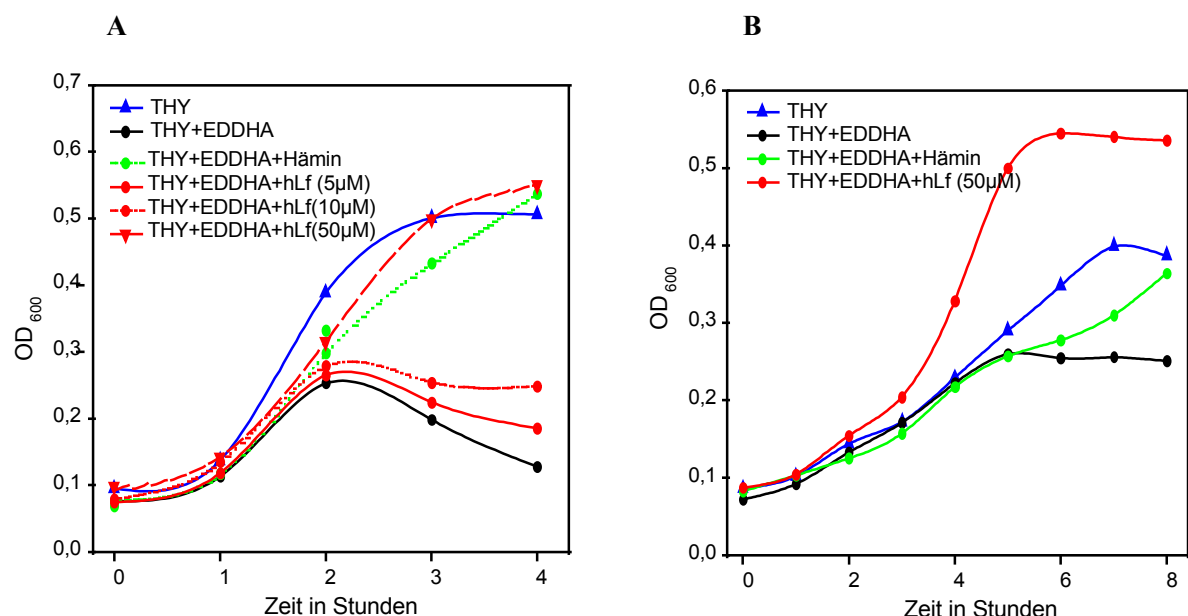


Abbildung 29: Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* unter eisenlimitierenden Bedingungen und bei Zusatz von Hämin und eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquellen. Die EDDHA-Konzentration betrug 50 μM , die Hämin-Konzentration 8 μM und die hLf-Konzentrationen 5 μM , 10 μM und 50 μM bei Sp132, sowie 50 μM bei Sp134. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt. **A:** Sp132 (klinisches Mastoidisolat aus Düsseldorf); **B:** Sp134 (klinisches Rachenisolat aus Düsseldorf).

Die 3 bisher untersuchten Pneumokokkenstämme wurden aus dem Nasopharynx von Patienten isoliert. Da bisher nur bei Isolaten aus dem Nasopharynx die Nutzung von Lactoferrin als Eisenquelle nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden die Nutzung von hLf bei Blutisolaten untersucht werden. Hierzu wurden das Blutisolat Sp109 und der Stamm D39 (Sp115), ein Serotyp 2-Referenzstamm, in den bereits beschriebenen Wachstumsversuchen untersucht (siehe Abb. 30 und Abb. 31).

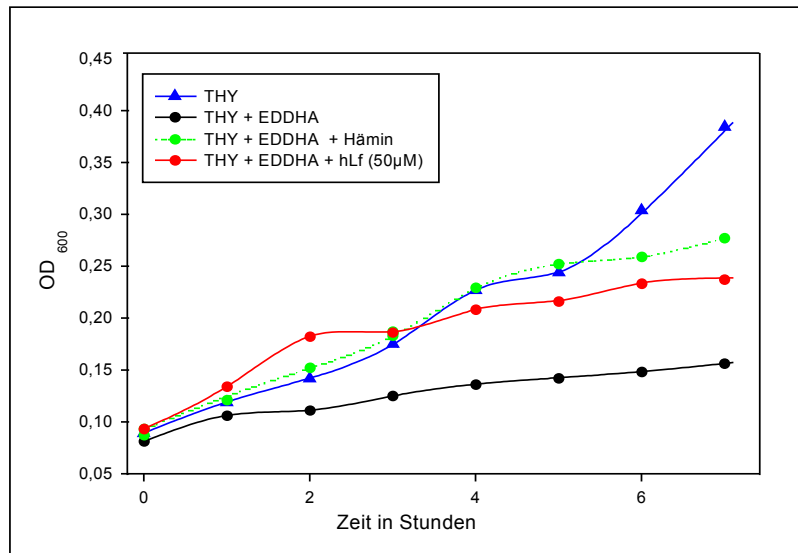


Abbildung 30: Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* Sp109 (klinisches Blutisolat aus Düsseldorf, Serotyp 7F) unter eisenlimitierenden Bedingungen und bei Zusatz von Häm und eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquellen. Die EDDHA-Konzentration betrug 1 mM, die Häm-Konzentration 8 μM und die hLf-Konzentration 50 μM. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

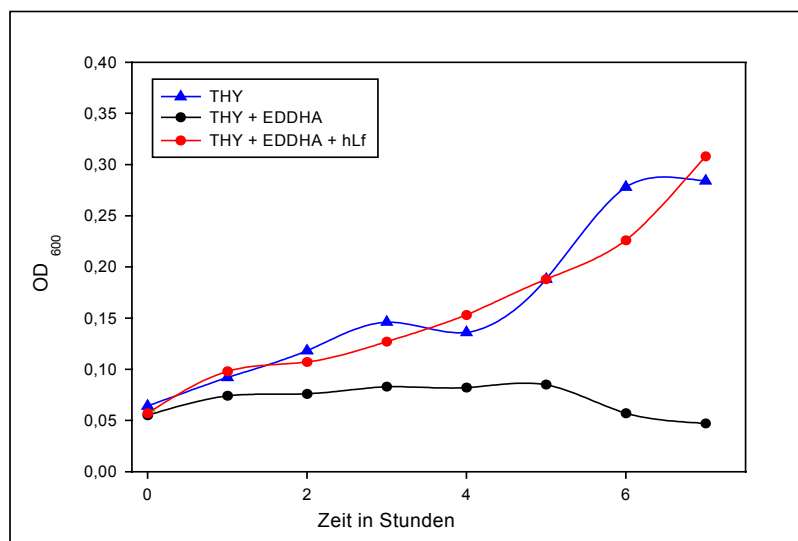


Abbildung 31: Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* D39 unter eisenlimitierenden Bedingungen und bei Zusatz von eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquelle. Die EDDHA-Konzentration betrug 1 mM und die hLf-Konzentration 50 μM. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

Es zeigte sich, daß der Stamm D39 ebenfalls mit hLf als einzige Eisenquelle wachsen konnten. Das Blutisolat zeigte im Vergleich zum THY-Medium jedoch nur ein geringeres Wachstum mit hLf, allerdings auch ein vermindertes Wachstum mit Hämin. Die Fähigkeit, humanes Lactoferrin als Eisenquelle zum Wachstum zu verwerten, war somit nicht auf Isolate des Nasopharynx beschränkt bzw. diese Fähigkeit wurde nicht beim Übertritt in die Blutbahn verloren.

Bei der Überprüfung des Wachstums von NCTC 7978 (Serotyp 3) mit Lactoferrin und Hämin konnte auch mit 50 μM hLf kein Wachstum beobachtet werden (*Abbildung 32*).

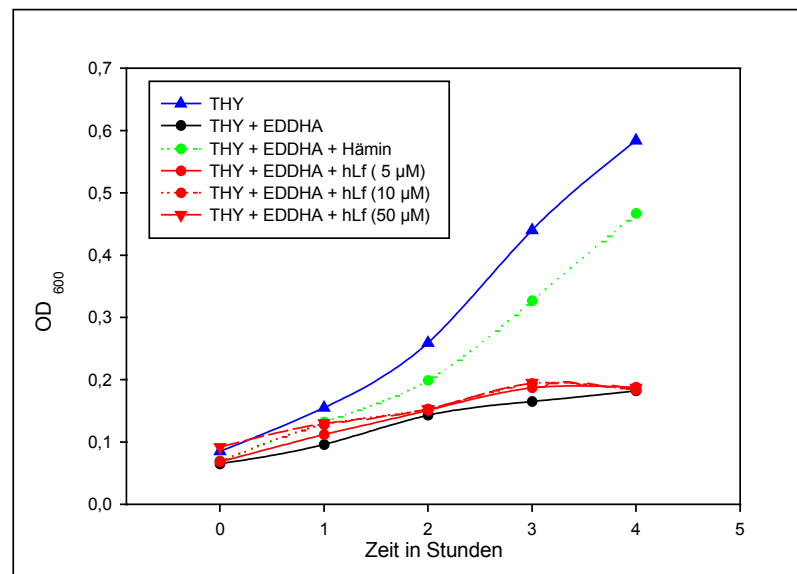


Abbildung 32: Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* NTCT 7978 (Sp36) unter eisenlimitierenden Bedingungen und bei Zusatz von Hämin und eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquellen. Die EDDHA-Konzentration betrug 2 mM, die Hämin-Konzentration 8 μM und die hLf-Konzentration 5 μM , 10 μM und 50 μM . Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt.

Obwohl dieser Stamm hLf in der Western-Blot Analyse (*Abb. 15*) und in den radioaktiven Bindungsversuchen (*Abb. 16*) band, konnte Lactoferrin nicht als Eisenquelle genutzt werden.

4.2.7.3 Konstruktion einer *pspA*-negativen Insertionsmutante

Bisherige Ergebnisse zeigten, daß PspA von *S. pneumoniae* humanes Lactoferrin spezifisch band und das Pneumokokken Lactoferrin als einzige Eisenquelle zum Wachstum nutzen konnten. Zur weiteren Charakterisierung der Bindung und deren Funktion wurde eine *pspA*-defiziente Mutante mittels Insertions-Duplikations-Mutagenese hergestellt. Diese für Pneumokokken erfolgreiche Methode wurde bereits von Chen und Morrison (1987)

beschrieben, bei der die natürliche Kompetenz von Pneumokokken ausgenutzt wurde. Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pJDC9 (siehe Anhang 7H). Der entsprechende *pspA*-5'-Bereich von Aminosäure 32 bis 167 wurde mit den Oligonukleotiden SW2 und SH38 mittels PCR amplifiziert und in die jeweilige *Bam*HI- bzw. *Hind*III-Schnittstelle des Vektors pJDC9 kloniert. Das resultierende Plasmid pJDC9::*pspA* (pMSH5) wurde für die Transformation in den *S. pneumoniae*-Stamm R6 verwendet. Zu einer Insertion des Plasmids in die chromosomale DNA kam es aufgrund der homologen Rekombination und einfaches Cross-over der *pspA*-Sequenz. Es erfolgte die Integration des Vektors in das Genom ab der entsprechenden Aminosäure 168. Der Vektor pJDC9 wies auf beiden Seiten der Klonierungsschnittstellen starke Transkriptionsterminatoren (T_1T_2 und t_0) auf, so daß es zu einer Termination der Proteinexpression von PspA nach der Aminosäure 167 kam. Zur Selektion der Transformanten besaß pJDC9 eine Erythromycin-Resistenz, die sowohl in *E. coli* als auch in *S. pneumoniae* aktiv war. Weiterhin befand sich in pJDC9 der Replikationsursprung ColE1, der die Replikation von pJDC9::*pspA* in *E. coli*, aber nicht in *S. pneumoniae* ermöglichte. *Abbildung 33* zeigt eine Übersicht über das Klonierungsschema.

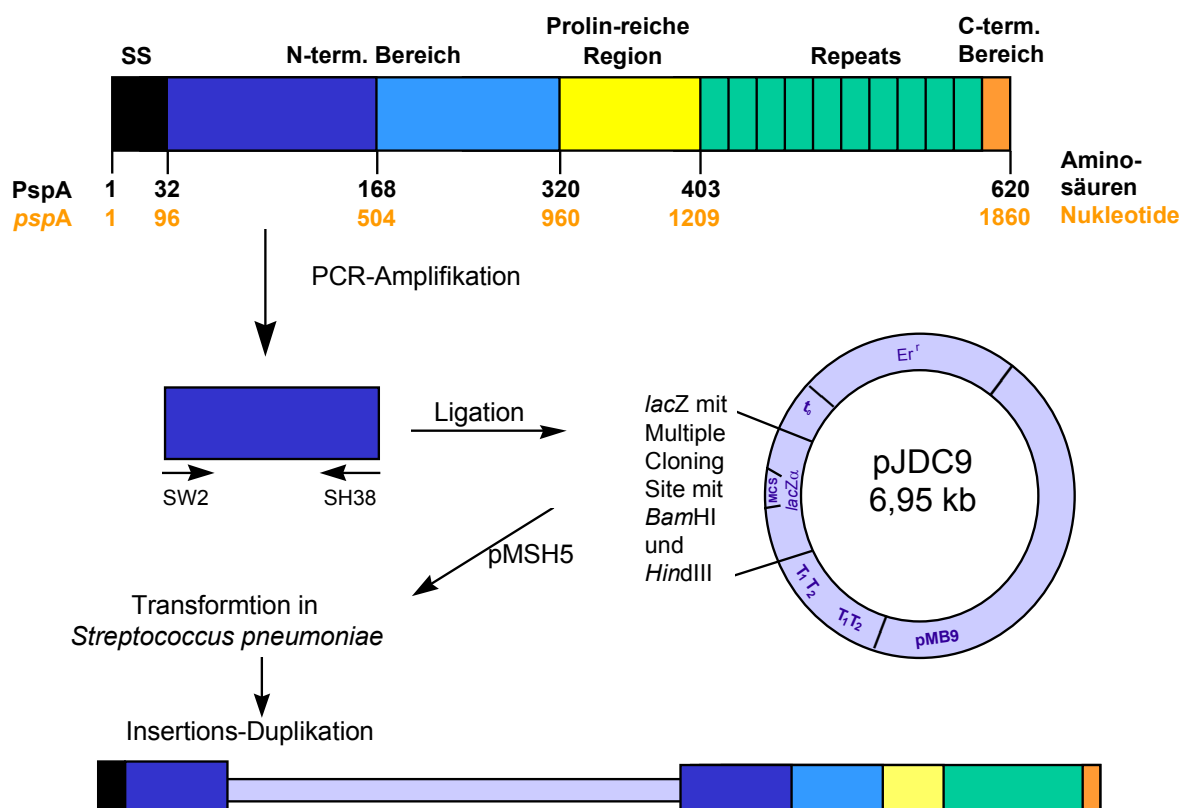


Abbildung 33: Klonierungsschema zur Insertions-Duplikations-Mutagenese des dem N-terminalen PspA-Fragmentes (Aminosäuren 32 bis 167) entsprechenden Genabschnitt (Nukleotid 96 bis 503) in den pJDC9-Vektor. Er^r: Erythromycin-Resistenz. T_1T_2 und t_0 : Transkriptionsterminatoren.

Für die Transformation in den Pneumokokkenstamm R6 (R6) wurde zunächst ein Kompetenzprofil erstellt. Hierzu wurde das Konstrukt pJDC9::*nanB* (Zysk, Düsseldorf) verwendet, das *S. pneumoniae* verschiedener Serotypen mit hoher Frequenz transformierte. Das Konstrukt pJDC9::*pspA* wurde bei der optischen Dichte mit maximaler Kompetenz in den Stamm R6 transformiert. Erythromycin-resistente Transformanden wurden isoliert und im Folgenden näher charakterisiert.

4.2.7.4 Überprüfung des Insertionsereignisses von pJDC9::*pspA* in *pspA* von *S. pneumoniae* R6

4.2.7.4.1 Southern-Blot Analysen

Der Beweis, daß das Plasmid pMSH5 in den *pspA*-Genlokus von *S. pneumoniae* integrierte, erfolgte durch Southern-Blot Analysen der chromosomalen DNA vom R6 und zwei selektionierter, Erythromycin-resistenter R6-*pspA*-Mutanten (pJDC9::*pspA*^{-1/-2}). Hierzu wurde die chromosomale DNA isoliert, mit *Hind*III verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Southern-Blot erfolgte die Inkubation mit einer DIG-markierten *pspA*-Sonde, die homolog zu dem 5'-Bereich des *pspA*-Gens des Stammes NCTC 7978 (Nukleotid 214 bis 1083) war. Die Detektion der Sonde erfolgte mittels Chemilumineszenz. Im Southern-Blot konnte *pspA* des Wildtyp-Stammes R6 auf einem ca. 4,4 kb Fragment detektiert werden (Abb. 34, Spur 1), während das Restriktionsfragment der R6-*pspA*-Mutanten eine Größe von ca. 12 kb aufwies (Abb. 34, Spur 2 und 3). Dieses Restriktionsfragmente beinhaltet das 4,4 kb Fragment des Wildtyps und das durch einfaches Cross-over integrierte Plasmid pJDC9::*pspA* in *pspA* mit einer Größe von 7,3 kb.

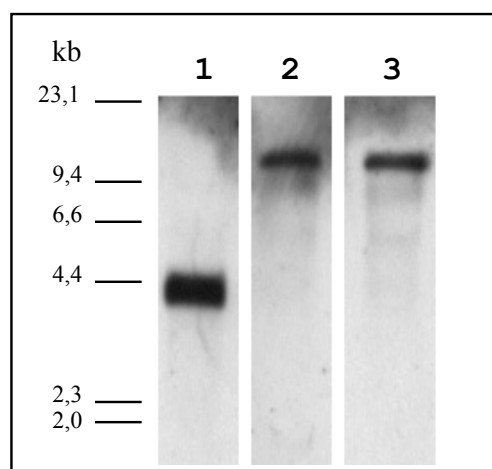


Abbildung 34: Southern-Blot Analyse der *Hind*III geschnittenen chromosomalen DNA von *S. pneumoniae*. 1: R6; 2: R6-*pspA*⁻¹; 2: R6-*pspA*⁻². Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten *pspA*-Sonde, die homolog zu dem 5'-Bereich von *pspA* von Nukleotid 214 bis 1083 ist.

4.2.7.4.2 Western-Blot Analysen

Die erfolgreiche Insertion des Plasmids pJDC9::*pspA* in *pspA* von R6 wurde desweiteren mit Western-Blot Analysen bestätigt. Hierzu wurde ein Proteinlysats von R6, R6-*pspA*⁻¹ und R6-*pspA*⁻² in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach erfolgtem Transfer auf eine PVDF-Membran auf die Bindung von anti-PspA-Antikörpern, sowie der Bindung von humanem Lactoferrin untersucht (Abbildung 35 A und B).

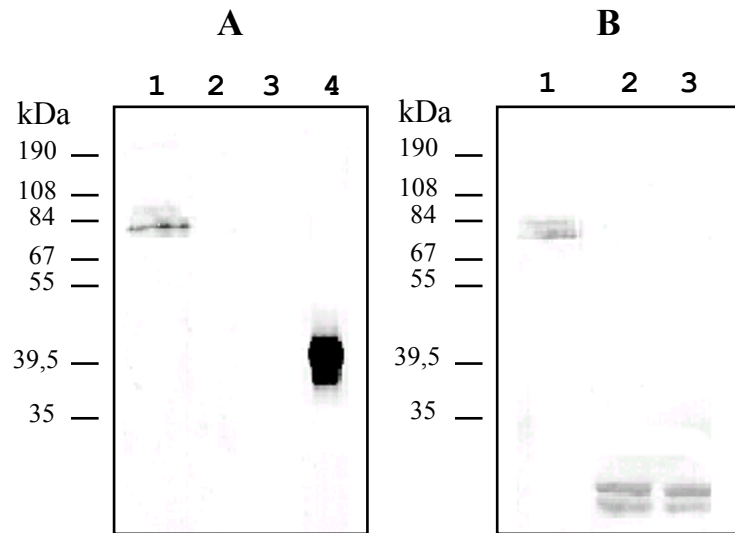


Abbildung 35: Western-Blot Analyse des Stamms R6 (Spur 1), R6-*pspA*⁻¹ (Spur 2), R6-*pspA*⁻² (Spur 3) und aufgereinigtes QP2 (Spur 4). **A:** Bindung von hLf. **B:** Bindung von anti-PspA-Antikörpern (anit-QP2).

Die Western-Blot Analysen von R6 ergaben, daß PspA mit anti-PspA-Antikörper reagierte und auch eine Bindung von hLf und anti-hLf erfolgte. Im Gegensatz dazu konnte bei den PspA-Mutanten R6-*pspA*⁻ keine Bindung von hLf und anti-hLf detektiert werden. Mit den anti-PspA-Antikörpern konnten jedoch Proteine einer Größe von ca. 20 - 25 kDa nachgewiesen werden. Dieses entspricht der Annahme, daß durch einfaches Cross-over die Insertion von pJDC9::*pspA* in *pspA* und eine Expression des PspA-Proteins von Aminosäure 1 bis 167 erfolgte. Der sich anschließende Vektor führte dann zum Abbruch der Transkription aufgrund der enthaltenen Terminatoren. An den integrierten Vektor rekonstituierte sich zwar das Zielgen, jedoch fehlten die Ribosombindungsstelle und der Promotor zur Expression von PspA.

4.2.7.4.3 PCR-Analysen

Die Insertion von pJDC9::*pspA* in *pspA* von R6 konnte ebenfalls durch PCR mit genomischer DNA von R6 und der PspA-Mutante R6-*pspA*⁻ bestätigt werden. Hierzu wurden die Primer-

kombinationen so gewählt, daß ein Oligonukleotid im Bereich von *lacZ* α des pJCD9-Vektors (pUC191) und das andere Oligonukleotid im 3'-Bereich des *pspA*-Gens (PPR2; PPR7; SH30) hybridisierte.

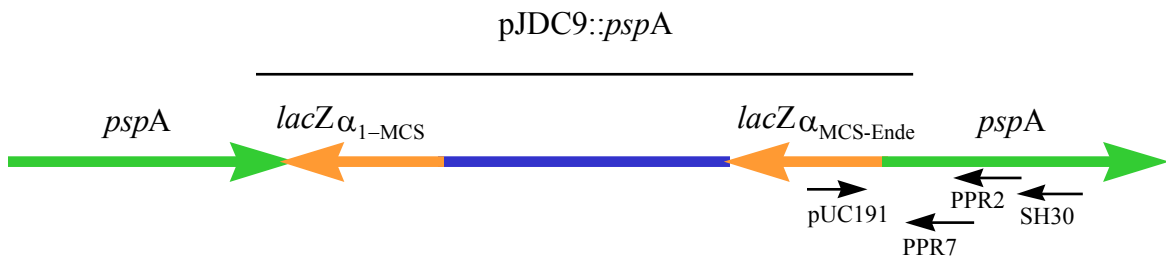


Abbildung 36: Schaubild des *pspA*-Genomabschnitts von R6-*pspA*⁻ nach erfolgreicher Insertion von pJDC9::*pspA*. Dargestellt sind die ungefähren Bindungsstellen und Orientierung der Primer pUC191, PPR2, PPR7 und SH30. *lacZ* α

Die Größen der PCR-Produkte entsprachen mit 1150 bp (pUC191/SH30), 950 bp (pUC191/PPR2) und 850 bp (pUC191/PPR7) den berechneten Fragmentgrößen. Kontrollreaktionen mit genomischer DNA von R6 und dem Vektorkonstrukt pMSH5 ergaben keine PCR-Produkt, da im Genom von R6 keine komplementäre Sequenz zu pUC191 und in pMSH5 keine komplementären Sequenzen zu PPR2, PPR7 und SH30 vorhanden waren .

4.2.7.5 Untersuchung der Lactoferrin-Bindungsaktivität von R6-*pspA*⁻

Zur Bestätigung, daß die *pspA*-Insertionsmutante R6-*pspA*⁻ im Vergleich zu dem Wildtyp R6 kein humanes Lactoferrin mehr binden konnte, wurde die Bindung von ¹²⁵I-hLf an R6-*pspA*⁻ im Bindungsversuch untersucht. Als Kontrolle wurden ebenso die Bindung von radioaktiv-markiertem hLf von R6 (Wildtypstamm) bestimmt (Abb.37).

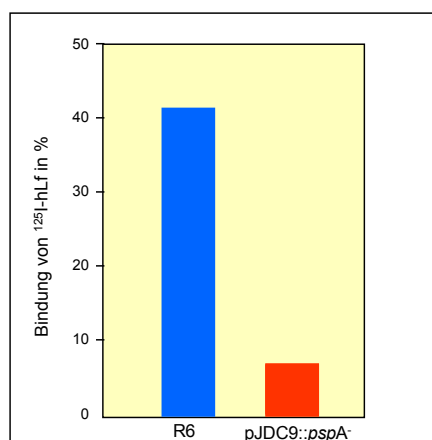


Abbildung 37: Bindungsversuch von ¹²⁵I-hLf an R6-*pspA*⁻ im Vergleich zu R6; die Bindung entspricht dem prozentualen Anteil zur eingesetzten Gesamtaktivität; Werte sind Mittelwerte von dreifach-Bestimmungen.

Die Bindungsaktivität für humanes Lactoferrin verminderte sich bei der *pspA*-Insertionsmutanten von 41% des Wildtypstammes R6 auf eine Restaktivität von 7%. Dieses entspricht einer Reduktion der Bindungsaktivität von R6-*pspA*⁻ gegenüber R6 von 83%.

4.2.7.6 Nutzung von humanem Lactoferrin als Eisenquelle beim Wachstum von R6-*pspA*⁻

Bisherige Ergebnisse zeigten, daß zum einen im Zelllysate von R6-*pspA*⁻ keine Bindung von humanem Lactoferrin nachgewiesen werden konnte (*Abb. 35A*) und zum anderen, daß sich die Bindungsaktivität von hLf an die Bakterien um 83% gegenüber dem Wildtyp R6 verringerte (*Abb. 37*). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob R6-*pspA*⁻ nicht mehr in der Lage war, humanes Lactoferrin als einzige Eisenquelle in einem eisenlimitierten Medium zu nutzen. Hierzu wurden zunächst die wachstumslimitierenden EDDHA-Konzentrationen für den Wildtypstamm R6 sowie für R6-*pspA*⁻ bestimmt. Diese lag bei 500 µM EDDHA in THY. Im anschließenden Wachstumsversuch wurde zum Medium mit EDDHA humanes Lactoferrin (50 µM) als einzige Eisenquelle zugefügt. Als Positivkontrolle wurde dem Medium Hämin (8 µM) zugesetzt. Die Wachstumskurven sind in *Abbildung 38* dargestellt.

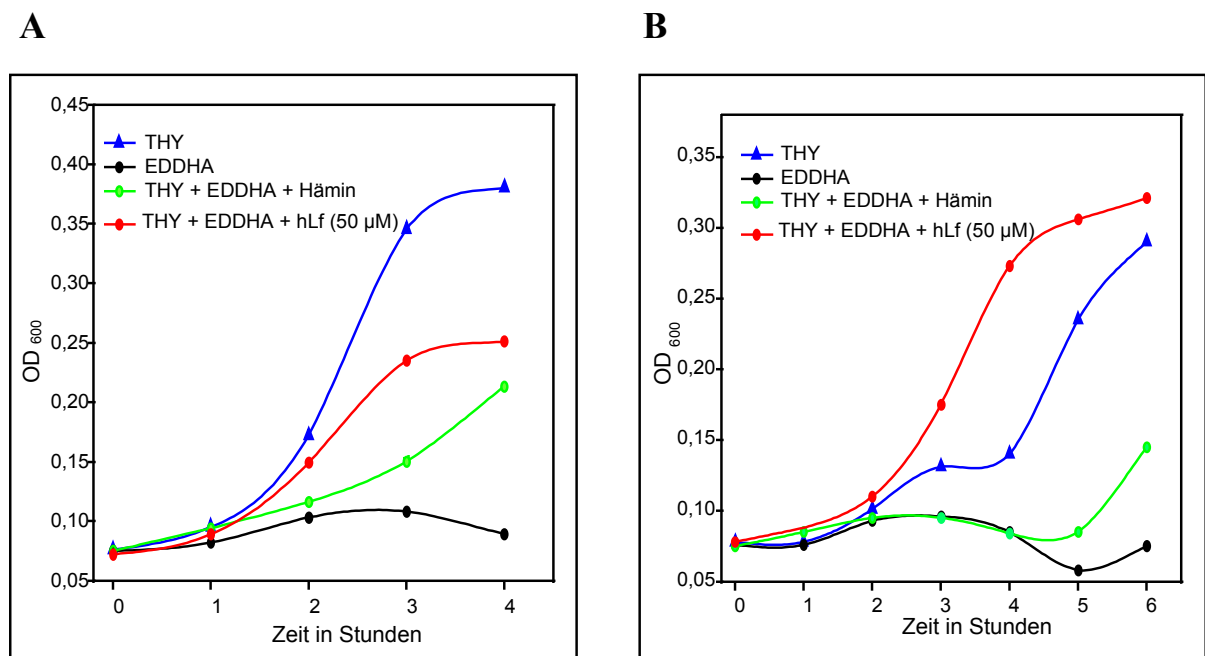


Abbildung 38: Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* unter eisenlimitierenden Bedingungen und bei Zusatz von Hämin und eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquellen. **A:** R6. **B:** R6-*pspA*⁻. Die EDDHA-Konzentration betrug 500 µM, die Hämin-Konzentration 8 µM und die hLf-Konzentration 50 µM. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

Die Ergebnisse der Wachstumskurven zeigten, daß sowohl der Wildtyp R6 als auch R6-*pspA*⁻ mit humanem Lactoferrin als einzige Eisenquelle wachsen konnten. R6-*pspA*⁻ zeigte im Vergleich zum Wildtyp sogar ein besseres Wachstum mit hLf. Gleichzeitig konnte über die Probenentnahme beim Wachstum und die anschließende Proteinanalyse in der Coomassie-Färbung gezeigt werden, daß zwar der Wildtyp, aber nicht R6-*pspA*⁻ humanes Lactoferrin zu binden vermag (Abb. 39).

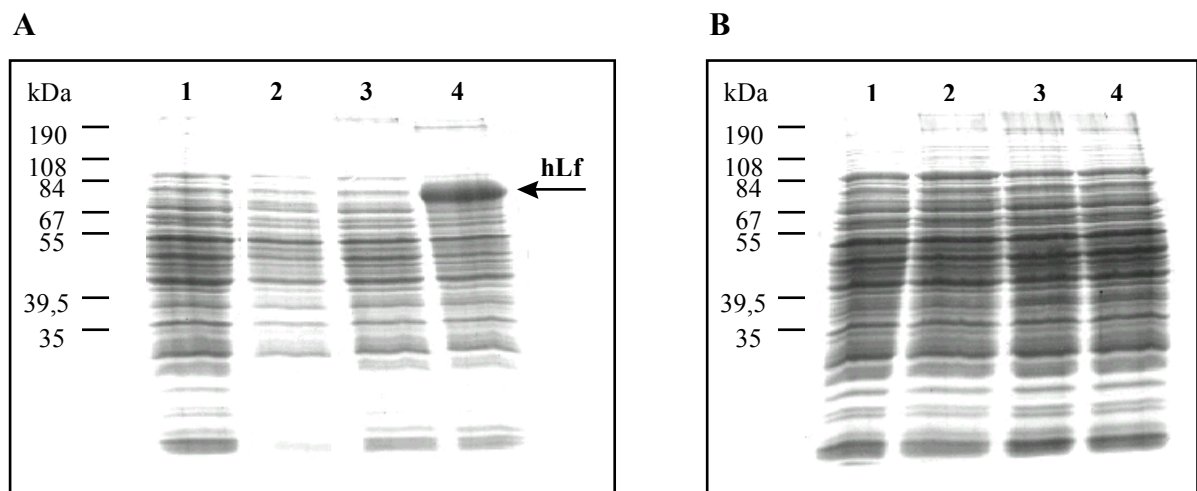


Abbildung 39: Wachstumsversuche zur Eisenaufnahme von Hämin und Fe-gesättigtem hLf; Coomassie-Färbung. **A:** R6. **B:** PspA-Mutante. Pos.1: THY; Pos.2: THY + EDDHA (500 µM); Pos.3: THY + EDDHA + Hämin (8 µM); Pos.4.: THY + EDDHA + hLf (50 µM).

Die Resultate dieser Proteinanalyse bestätigten die Ergebnisse der Western-Blot Analysen der Proteinlysate (Abschnitt 4.2.7.4.2), sowie den Bindungsversuchen mit ¹²⁵I-hLf von R6 und R6-*pspA*⁻ (4.2.7.5).

4.2.7.7 Untersuchung der proteolytischen Aktivität von *S. pneumoniae* und R6-*pspA*⁻ gegenüber humanem Lactoferrin

Bei Bakterien existieren für die Aufnahme von Eisen, daß an Eisentransportproteine komplexiert ist, vier verschiedene Mechanismen (Bullen und Griffiths, 1987). Eine Möglichkeit Eisen vom Wirt aufzunehmen, ist die Produktion niedermolekularer, hochaffiner Eisenchelatoren - sogenannte Siderophore, die eine höhere Affinität zum Eisen aufweisen als die Glykoproteine. Bei *S. pneumoniae* konnten allerdings keine Siderophore nachgewiesen werden (Tai *et al.*, 1993). Eine weitere Möglichkeit ist die Reduktion des Eisens im Glykoprotein vom Fe³⁺ zum Fe²⁺ über ein 'Reduktant' und anschließender Freisetzung des Eisens (Cowart und Foster, 1985). Ein anderer Mechanismus ist die Bindung des Eisentransportproteins an Rezeptoren der bakteriellen Oberfläche (Otto *et al.*, 1992). Die

Bindung von hLf erfolgte bei Pneumokokken über PspA, jedoch mußte ein weiterer Mechanismus existieren, da R6-*pspA*⁻ ebenfalls hLf als einzige Eisenquelle zum Wachstum nutzen konnte, ohne es direkt zu binden. Dieser Mechanismus wurde zum ersten Mal bei verschiedenen Stämmen von *Bacteroides* (Carlsson *et al.*, 1984) und *Vibrio cholera* (Ascencio *et al.*, 1992) beobachtet. Diese Stämme konnten Lactoferrin proteolytisch spalten, somit die Konformation der Eisenbindungsstelle zerstören und die Freisetzung des Eisens bewirken.

Bei Pneumokokken sollte zunächst untersucht werden, ob sie immobilisiertes Lactoferrin ähnlich dem Versuchsaufbau von Ascencio *et al.* (1992) spalten können. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit radioaktiv markiertem hLf immobilisiert und nach dem Entfernen von nicht-gebundendem hLf wurden Pneumokokken in physiologischer Lösung hinzugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde aus dem jeweiligen Ansatz eine Probe entnommen und die Radioaktivität in ‘counts per minute (cpm)’ bestimmt. Dieses entsprach der abgespaltenen Aktivität von radioaktiv-markiertem Lf. Dieser Versuchsaufbau wurde als ‘Fest-Phasen-Protease-Versuch’ bezeichnet und ist bereits von Ascencio *et al.* (1992) zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von *Vibrio cholerae* gegenüber Lactoferrin beschrieben. Der Versuch wurde mit den Pneumokokkenstämmen R6, NCTC 7978 (Serotyp 3) und einem Nasopharynx-Isolat (Sp129) durchgeführt (Abbildung 40).

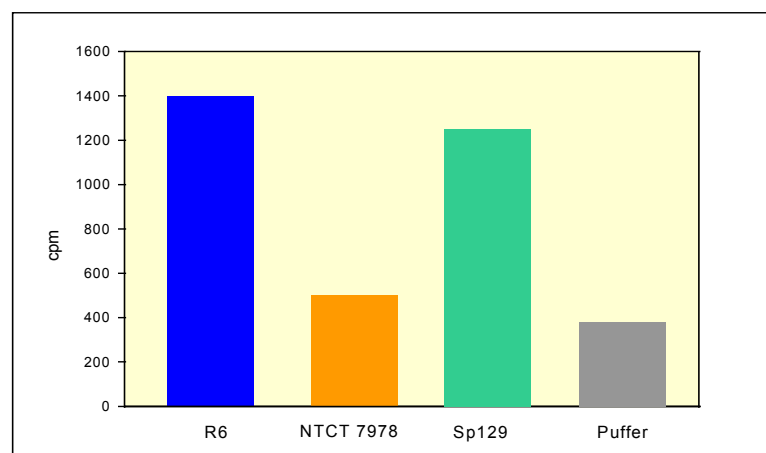


Abbildung 40: Fest-Phasen-Protease-Versuch mit *S. pneumoniae*: R6, NCTC 7978 (Serotyp 3) und Sp129 (Nasopharynxisolat). Messung der proteolytischen Aktivität der Pneumokokken gegenüber immobilisiertem humanen Lactoferrin nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C. Die abgespaltene Radioaktivität ist in ‘counts per minute’ (cpm) angegeben. Werte sind Mittelwerte von dreifach-Bestimmungen.

Die *S. pneumoniae*-Stämme R6 und das Nasopharynxisolat Sp129 zeigten gegenüber dem radioaktiv-markiertem und immobilisiertem humanen Lactoferrin eine proteolytische

Spaltungsaktivität auf. Die Aktivität von NCTC 7978 ähnelte der Negativkontrolle (Puffer). Der Mechanismus der proteolytischen Spaltung sollte nun für R6-*pspA*⁻ überprüft werden (Abbildung 41).

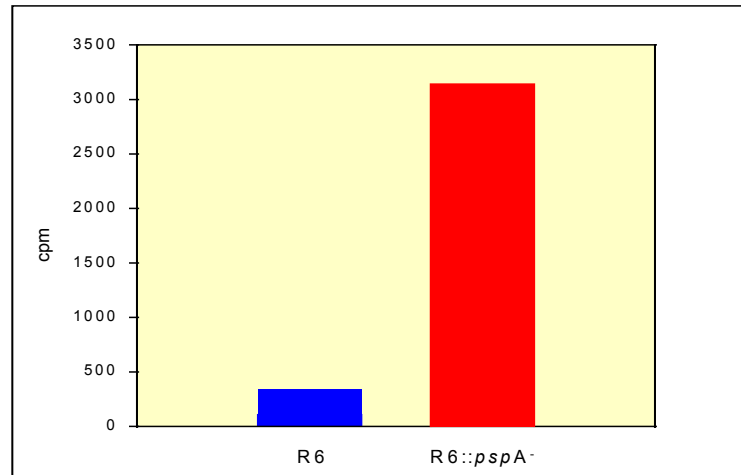


Abbildung 41: Fest-Phasen-Protease-Versuch mit R6-*pspA*⁻ im Vergleich zum Wildtypstamm R6. Messung der proteolytischen Aktivität der Pneumokokken gegenüber immobilisiertem humanen Lactoferrin nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C. Die abgespaltene Radioaktivität ist in 'counts per minute' (cpm) angegeben. Werte korrigiert um die Negativkontrolle (Puffer, 150 cpm); Werte sind Mittelwerte von dreifach-Bestimmungen.

Im Vergleich zum Wildtyp R6 ist die proteolytische Aktivität von R6::*pspA*⁻ gegenüber hLf 8-fach erhöht.

4.2.7.8 Untersuchung der proteolytischen Aktivität von PspA von *S. pneumoniae*

Bisherige Ergebnisse zeigten, daß R6::*pspA*⁻ kein Lactoferrin binden, allerdings mit eisengesättigtem humanen Lactoferrin als Eisenquelle wachsen konnte. Weiterhin wurde beobachtet, daß R6::*pspA*⁻ im Vergleich zum Wildtyp R6 ein verstärktes Wachstum mit hLf und eine erhöhte proteolytische Aktivität gegenüber Lf aufwies. Da R6::*pspA*⁻ im Vergleich zu R6 ein verkürztes PspA-Protein synthetisierte, sollte zunächst untersucht werden, ob PspA für die Spaltung von immobilisiertem hLf verantwortlich war. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit hLf immobilisiert, aufgereinigtes PspA zugegeben und nach einer Inkubation bei 37°C wurde die abgespaltene Aktivität in cpm gemessen. Es wurden die PspA-Fragmente QP2 (Aminosäure 32 bis 319, Abbildung 22) und QP3 (Aminosäure 105 bis 319; Abbildung 22) in diesem Versuch eingesetzt.

Für die Proteinfragmente QP2 und QP3 wurde eine lineare Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität gegenüber humanem Lactoferrin und der eingesetzten Proteinkonzentration beobachtet (Abb. 42).

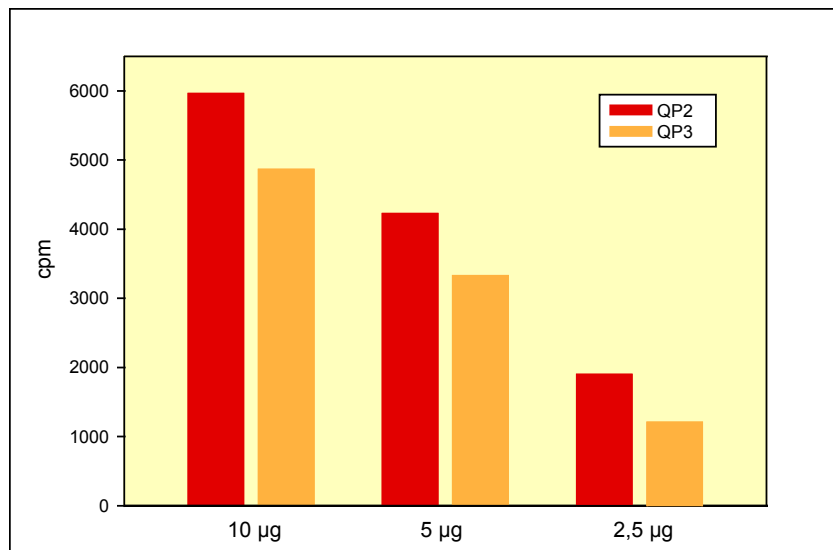


Abbildung 42: ‘Fest-Phasen-Protease-Versuch’ mit aufgereinigtem QP2 und QP3. Messung der proteolytischen Aktivität von QP2 und QP3 gegenüber immobilisiertem humanen Lactoferrin nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C. Die abgespaltene Radioaktivität ist in ‘counts per minute’ (cpm) angegeben; die Zahlen 10 µg, 5 µg und 2,5 µg entsprechen den eingesetzten Proteinmengen; Werte sind Mittelwerte von dreifach-Bestimmungen, bereinigt um den Hintergrundwert (Puffer, 300 cpm).

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß PspA neben der Lactoferrin-Bindungsaktivität ebenfalls eine proteolytische Aktivität gegenüber humanem Lactoferrin aufweist. Die Domäne der proteolytische Aktivität von PspA konnte auf die Aminosäuren 105 bis 167 eingeschränkt werden, da zum einen QP3 (Aminosäure 105 bis 282) hLf spaltet und zum anderen R6-*pspA*⁻ ein PspA-Fragment bis Aminosäure 167 synthetisiert, das ebenfalls hLf spalten kann (Abb. 41).

Die Suche nach ähnlichen Sequenzen der Aminosäuren 105 bis 167 von PspA in den Proteindatenbanken ergab keine Homologien zu anderen Sequenzen mit proteolytischer Aktivität.

Anschließend sollte die Proteolyseaktivität gegenüber löslichem hLf untersucht und die Fragmentgrößen des Lactoferrins nach erfolgter Proteolyse bestimmt werden. Hierzu wurden zu dem Wildtyp R6, R6-*pspA*⁻, *S. pneumoniae* Serotyp 3 (NCTC 7978) und zu aufgereinigtem PspA (QP2) radioaktiv markiertes humanes Lactoferrin hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, die Proteine des Überstandes mit Trichloressigsäure gefällt, das Bakteriensediment und die gefällten Proteine in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf einem Whatmanpapier getrocknet. Es folgte die Autoradiographie des getrockneten Gels (Abbildung 43).

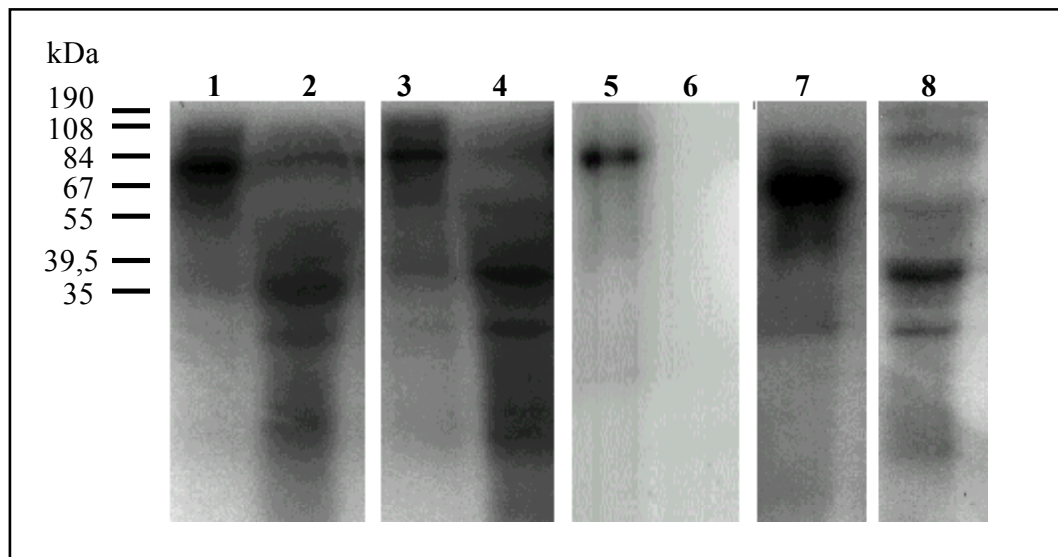


Abbildung 43: Protease-Versuch zur Spaltung von löslichem humanen Lactoferrin von R6-*pspA*⁻ im Vergleich zu den *S. pneumoniae*-Stämmen R6, NCTC 7978 (Serotyp 3) und aufgereinigtem PspA (QP2). 1: R6-Bakteriensediment; 2: R6 - Überstand mit TCA-gefällt (TCA-ÜS); 3: R6-*pspA*⁻-Bakteriensediment; 4: R6-*pspA*⁻-TCA-ÜS; 5: NCTC 7978-Bakteriensediment; 6: NCTC 7978-TCA-ÜS; 7: ¹²⁵I-hLf; 8: QP2-TCA-ÜS.

Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, daß sowohl der Wildtyp R6 als auch R6-*pspA*⁻ Lactoferrin proteolytisch spalten können. Es wurden Fragmente unterschiedlicher Größe erhalten, wobei die beiden Hauptfragmente eine Größe von ca. 36 kDa und 30 kDa aufweisen. Diese beiden Fragmente wurden ebenfalls mit dem PspA-Protein (QP2) im Versuchsansatz erhalten (Abb. 43, Spur 8). Im Gegensatz zum Wildtyp R6 wurde bei R6-*pspA*⁻ weniger Lactoferrin im Bakteriensediment (Abb. 43, Spur 1 und 3) und eine höhere Konzentration der Spaltprodukte (Abb. 43, Spur 2 und 4) nachgewiesen. Eine Besonderheit war bei dem Stamm NCTC 7978 zu beobachten. Dieser Stamm konnte zwar Lactoferrin binden (Abb. 43, Spur 5), allerdings fand keine proteolytische Spaltung statt (Abb. 43, Spur 5). Da in Wachstumsversuchen ebenfalls kein Wachstum von NCTC 7978 mit eisengesättigtem humanen Lactoferrin beobachtet werden konnte (Abb. 32), besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Proteolyse des Lactoferrins und dem Wachstum mit Lactoferrin als einzige Eisenquelle. Diese Ergebnisse beweisen, daß bei Pneumokokken die proteolytische Spaltung von humanem Lactoferrin ein grundlegender Bestandteil des Mechanismus der Eisenaufnahme von Lactoferrin und damit des Wachstums ist.

4.2.7.9 Vergleich der Proteinsequenz von PspA verschiedener *S. pneumoniae* Stämmen

Die Bindung und Proteolyse von humanem Lactoferrin erfolgte durch das PspA der Pneumokokken. Der Verlust der proteolytischen Aktivität des Serotyp 3-Stammes NCTC 7978 mußte demnach in einer veränderten Aminosäuresequenz begründet sein. Die

Nukleotidsequenz von *pspA* des Stammes NCTC 7978 wurde mittels PCR-Sequenzierungsreaktion bestimmt. Die entsprechende Proteinsequenz ist in Abb. 44 dargestellt.

Yother:	MNKKKMILTSLASVAILGAGFVASQPTVVRA	Signal-sequenz
NCTC 7978:	MNKKKMILTSLASVAILGAGFVASQPTVVRA	
Yother:	EESFVASQSKAEKDYDAKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKYDEDQ	N-terminaler Bereich
NCTC 7978:	EESFVASQSKAEKDYDAKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKYDEDQ	
Yother:	KKTEEKAALEKAASEEMDKAVAAVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEA	
NCTC 7978:	KKTEEKAALEKAASEEMDKAVAAVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEA	
Yother:	KKREEEAKTKFNTVRA-MVVPEPEQLAETKKKSEEAKQKAPELTKKLEEA	
NCTC 7978:	KKREEEAKKFTTIRTTMVVPEPEQLAETKKKAAEAKAKEPKLAKKAAEA	
Yother:	KAKLEEAEEKKATEAKQKVDAAEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDESE	
NCTC 7978:	KAKLEEAEEKKATEAKQKVDAAEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDESE	
Yother:	SEDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKA	
NCTC 7978:	SEDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKA	
Yother:	AEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKTEADLKKAVNE-----	Prolin-reiche Region
NCTC 7978:	AEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKTEADLKKAVNE-----	
Yother:	PEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAPAEQPKPEK	Prolin-reiche Region
NCTC 7978:	PEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPKPEKPAPAEQPKPEK	
Yother:	TDDQQAEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPAPAPK-----	Repeat-Region
NCTC 7978:	TDDQQAEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPAPAPK-----	
Yother:	TGWKQENGMWYFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMA	Repeat-Region
NCTC 7978:	TGWKQENGMWYFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMA	
Yother:	TGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMA	Repeat-Region
NCTC 7978:	TGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMA	
Yother:	TGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWVKDGDWTWYYLEASGAMKA	Repeat-Region
NCTC 7978:	TGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWVKDGDWTWYYLEASGAMKA	
Yother:	SQWFKVSDKWYYVNGLGALA	C-terminaler Bereich
NCTC 7978:	SQWFKVSDKWYYVNGLGALA	
Yother:	VNTTVDGYKVNANGEWV	C-terminaler Bereich
NCTC 7978:	VNTTVDGYKVNANGEWV	

Abbildung 44: Vergleich der Proteinsequenz von PspA verschiedener Pneumokokkenstämme. Yother: PspA-Sequenz vom Stamm D39 (Serotyp 2) - Accessionnummer: M74122 der EMBL-Datenbank; NCTC 7978 (Serotyp 3). Die orangefarbenen Bereiche markieren unterschiedliche Aminosäuren der Sequenz von NCTC 7978 zur Sequenz von Yother; der grüne Bereich markiert die Sequenz des 15er Peptids, das als Lactoferrinbindungsmotiv bestimmt wurde. Der Bereich mit der möglichen proteolytischen Aktivität gegenüber hLf ist mit den roten Pfeilen angegeben (Aminosäure 105 bis 167).

Diese Sequenz wurde mit der bereits veröffentlichten PspA-Sequenz des Stammes D39 (Serotyp 2) von Yother und Briles (1992) verglichen (Abbildung 44).

Der Pneumokokkenstamm D39 entspricht dem Stamm Sp115 unserer Stammsammlung, für den die Nutzung von hLf zum Wachstum nachgewiesen werden konnte (*Abb. 31*). D39 ist die bekapselte Variante vom Stamm R6 und für R6 konnte die proteolytische Spaltung von Lactoferrin gezeigt werden (*Abb. 43*, Spur 2).

Der Vergleich der PspA-Sequenzen ergab, daß in dem Bereich mit der proteolytischen Aktivität gegenüber humanem Lactoferrin bei dem Stamm NCTC 7978 sechs Aminosäuren auf der Länge von 10 Aminosäuren ausgetauscht sind. In der *Tabelle 8* wurde auf die biochemischen Wechselwirkungen der Aminosäureaustausche in diesem Sequenzbereich eingegangen.

Tabelle 8: Vergleich der unterschiedlichen Aminosäuren von D39 und NCTC 7978 im Bereich der Protease-Aktivität von PspA gegenüber humanem Lactoferrin.

D 39 (Serotyp 2)

NCTC 7978 (Serotyp 3)

Aminosäure	Aminosäure (Name)	Eigenschaft der Seitenkette	Hydrophilie	Aminosäure	Aminosäure (Name)	Eigenschaft der Seitenkette	Hydrophilie
K	Lysin	basisch - polar	+	R	Arginin	basisch - polar	+
T	Threonin	ungeladen - polar	+	A	Alanin	unpolar	-
N	Asparagin	ungeladen - polar	+	T	Threonin	ungeladen - polar	+
V	Valin	unpolar	-	I	Isoleucin	unpolar	-
A	Alanin	unpolar	-	T	Threonin	ungeladen - polar	+
-	-		-	T	Threonin	ungeladen - polar	+

Bei drei von den sechs unterschiedlichen Aminosäuren erfolgte ein Austausch mit einer ähnlichen Aminosäure, d.h. mit gleicher Eigenschaft der Seitenkette. Lysin wurde durch Arginin, Asparagin durch Threonin und Valin durch Isoleucin ausgetauscht. Bei zwei weiteren Aminosäuren erfolgte der Austausch mit einer Aminosäure, deren Seitenkette eine andere Polarität aufwies. Hierbei wurde Threonin durch Alanin und Alanin durch Threonin ausgetauscht. Des weiteren konnte bei PspA von NCTC 7978 eine zusätzliche Aminosäure - Threonin - beobachtet werden. Unterschiede der Sequenzen von D39 und NTCT 7978 sind demnach für die fehlende Protease-Aktivität von NTCT 7978 verantwortlich

5 Diskussion

Streptococcus pneumoniae gehört zur natürlichen Flora des oberen menschlichen Respirationstraktes und gilt als weltweit häufigster Verursacher von bakteriellen Infektionen, die vor allem bei Kleinkindern bis zu 2 Jahren, bei älteren und bei immunsupprimierten Personen zum Tode führen können (Gray *et al.*, 1979; Siber, 1994; Ridgway *et al.*, 1995). Trotz der permanenten Weiterentwicklung von Antibiotika liegt die Mortalität bei den durch Pneumokokken verursachten Erkrankungen aufgrund vermehrt auftretender Antibiotikaresistenzen auf einem konstant hohem Niveau (Gillespie, 1989; Appelbaum, 1992; deNeeling, 1996). Da die Bekämpfung einer bereits existierenden Pneumokokkeninfektion aufgrund der Antibiotikaresistenzen problematisch ist, gilt es, eine Infektion zu verhindern. Allerdings ist der Einsatz des bereits existierenden Impfstoffs gegen Pneumokokken (Pneumovax®) aufgrund des Polysaccharidcharakters nur begrenzt effektiv (Van Dam *et al.*, 1990; Shapiro *et al.*, 1991). Durch die Kombination einer begrenzten Anzahl an Polysacchariden mit einem Diphtherietoxoid gelang die erfolgreiche Immunisierung von Kleinkindern bis 15 Monaten (Breukels *et al.*, 1999; Shinefield *et al.*, 1999; Black *et al.*, 2000, Eskola *et al.*, 2001), jedoch blieb dieser Impfstoff (PCV®) bei der weiteren Hauptrisikogruppe, den älteren Personen, unwirksam (Shelly *et al.*, 2001). Diese Problematik erfordert die Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen von *S. pneumoniae* und die Identifizierung von beteiligten Virulenzfaktoren. Das Ziel ist die Entwicklung eines neuen Impfstoffes auf Proteinbasis.

Als potentielle Virulenzfaktoren gelten im allgemeinen Oberflächenproteine von Bakterien. Bei *S. pneumoniae*, sowie weiteren humanpathogenen Bakterien (*Streptococcus mutans* und *Clostridium difficile*) konnte bisher eine Gruppe von Oberflächenproteinen mit einem speziellen Verankerungsmechanismus in der Zellwand identifiziert werden, die aufgrund einer repetitiven Struktur im C-terminalen Bereich der Proteine an das Phosphorylcholin der Teichonsäure in der Zellwand binden (Tabelle 3). Bei diesen Proteinen handelt es sich um sogenannte 'cholinbindende Proteine' (Cbp), die eine unterschiedliche Anzahl an Repeats aufweisen. Auch bei Proteinen von Listerien wurde eine Repeatstruktur nachgewiesen, über die die Proteine an die Membran assoziiert und nicht kovalent gebunden sind. Die Repeats beginnen mit einem 'GWV'-Motiv und eine ähnliche Bindung wie bei Pneumokokken wird diskutiert (Braun *et al.*, 1997).

Zu den bei *S. pneumoniae* identifizierten Cbp gehören das Autolysin, PspA, PcpA und SpsA. Diese Proteine lösen im Mausmodell eine protektive Immunantwort aus, wobei PspA der am umfangreichsten untersuchte Impfstoffkandidat ist. Die biologische Funktion von PspA im Infektionsprozeß war allerdings unbekannt.

Zur Identifizierung neuer cholinbindender Proteine wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Verfahren gewählt. Zunächst wurde eine chromosomale Phagenbank von *S. pneumoniae* auf das Vorhandensein verschiedener Genfragmente untersucht, die homolog zu der repetitiven Struktur von *spsA* waren. Nach der Isolierung verschiedener positiv-reagierenden Genfragmente wurden diese oder die von ihnen codierten Proteine sequenziert. Die Mehrzahl der erhaltenen Klone waren *spsA* und *pspA*. Dieses Ergebnis war aufgrund der hohen Homologie (98 - 100%) der repetitiven Sequenzen zwischen *spsA* und *pspA* zu erwarten. Allerdings konnten auch *lytA* und *pcpA* nachgewiesen werden, die mit 71% (*pcpA*) und 68% (*lytA*) eine geringere Homologie zu *spsA* aufwiesen (Abb. 5). Die Sequenzierung weiterer Klone ergab jedoch kein weiteres Gen mit der gesuchten repetitiven Struktur. Aufgrund der Klonierung von *lytA* und *pcpA* aus der Pneumokokkenphagenbank ist der gewählte Ansatz zur Identifizierung neuer cholinbindender Proteine zwar erfolgreich - das *pcpA*-Gen wurde erst während dieser Arbeit von Sanchez-Beato *et al.* 1998 veröffentlicht - allerdings ohne automatisierter PCR-Sequenzierung zu umfangreich. Zu diesem Zeitpunkt wurde die gesamte Genomsequenz eines Pneumokokkenstammes - eingeteilt in 378 noch nicht annotierte Abschnitte - in der TIGR-Datenbank frei zugänglich. Die Sequenzierung der Klone wurde abgebrochen und eine neue Strategie zur Identifizierung neuer cholinbindenden Proteine gewählt. Hierbei wurde mit einem speziellen Computersuchprogramm (BLAST) das gesamte Genom auf homologe Abschnitte zur Repeatsequenz von SpsA und PspA abgesucht. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes wurde die Homologiesuche auf Proteinebene durchgeführt, um eine erhöhte Anzahl an Homologien zu ermöglichen. Es konnten mit dieser Methode 6 neue Proteine identifiziert werden (Tabelle 5). Von diesen Proteinen wurde das Protein aus dem Genomabschnitt 4139 zur näheren Charakterisierung ausgewählt, da es mit 627 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 72 kDa das größte dieser neuen Proteine war und ebenfalls die höchste Anzahl an repetitiven Einheiten (10) aufwies (Abbildung 12 und 13F). Der entsprechende Genabschnitt des 5'-Bereiches ohne Repeatstruktur wurde aus einem Pneumokokkenstamm des Serotyps 2 amplifiziert, in den pQE-Expressionsvektor ligiert und das codierende Protein in *E. coli* überexprimiert. Das 38 kDa große Protein wurde anschließend auf die Bindung verschiedener humaner

Plasmabestandteile getestet, doch konnte nur eine sehr schwache Bindung von humanem Fibrinogen und humanem IgG gezeigt werden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und dem polyklonalen Antiserum gegen P4139 konnte die Oberflächenlokalisation nachgewiesen werden. Gleichzeitig zu dieser Arbeit veröffentlichte Gosink *et al.* (2000) die Sequenzen von 6 neuen cholinbindenden Proteinen, die mit CbpD, E, F, G, I, und J bezeichnet wurden und die identisch mit denen in dieser Arbeit identifizierten Cbp sind (*Tabelle 5*). Das Protein P4139 entspricht hierbei dem CbpE. Für CbpE und G konnte eine Beteiligung bei der Kolonisierung des Nasopharynx aufgezeigt werden, da Defektmutanten im Rattenmodell eine verringerte Adhärenz an Zellen des Nasopharynx aufwiesen. CbpG wurde als mögliche Serinprotease identifiziert (Gosink *et al.*, 2000). Eine weitere Charakterisierung dieser neuen cholinbindenden Proteine hinsichtlich ihres Virulenzpotentials erfolgte bisher nicht. Die computerunterstützte Analyse des Pneumokokkengenoms hinsichtlich besonderer Sequenzstrukturen ist eine erfolgreiche und vor allem zeitsparende Methode, um neue Proteine mit bestimmten Sequenzmotiven zu identifizieren. Wizemann *et al.* (2001) konnten im Genom 130 ORF mit Sekretionsmotiven identifizieren, von denen 3 bisher unbekannte Proteine als potentielle Vakzinkandidaten im Mausmodell protektive Antikörper gegen eine Pneumokokkeninfektion hervorbrachten.

Für die cholinbindenden Proteine von *S. pneumoniae*, sowie *Streptococcus mutans* und *Clostridium difficile* konnte bisher nachgewiesen werden, daß es sich um Virulenzfaktoren handelt. Allerdings ist die biologische Funktion nicht für alle Proteine aufgeklärt. Eine mögliche Funktion ist die Bindung von Serumproteinen und vor allem bei Pneumokokken die Bindung von Proteinen der Mukosa, da die Kolonisierung des menschlichen Wirts über den Respirationstrakt erfolgt. Die Besiedlung des Respirationstraktes ist der erste und entscheidende Schritt der Pathogenese, bei dem die Wirtsabwehr geschwächt und die Versorgung durch essentielle Nahrungsbestandteile gewährleistet sein muß. Zu diesen essentiellen Elementen gehört Eisen, das für viele Oxidations-Reduktionsprozesse, als Kofaktor für Enzyme, sowie als Regulationssignal (z.B. für Toxine) benötigt wird (Robins-Browne und Prpic, 1985). Der Mensch enthält ca. 3-5 g Eisen (Litwin und Calderwood, 1993), doch liegt das meiste Eisen in gebundener Form in Ferritin, Hämosiderin, Myoglobin und Hämoglobin vor. Neben diesen Eisenbindungsproteinen sind verschiedene Plasmaproteine am Transport des Eisen im Körper beteiligt. Das sind Transferrin als Transportmittel zu Knochenmarkszellen, Milz, Leber, Dünndarm und den Muskeln (Weinberg, 1978); Haptoglobin, welches Hämoglobin bindet und es zur Leber transportiert

(Hershko, 1975) und Hämopexin, das Häm bindet und es ebenfalls zur Leber transportiert (Muller-Eberhard und Morgen, 1975). Lactoferrin (Lf) ist dem Transferrin (Tf) ähnlich, doch im Gegensatz zu Tf, das im Serum zu finden ist, kommt Lf hauptsächlich in der Milch und der Mukosa vor. Die eisenbindenden Proteine weisen eine sehr hohe Affinität zu freiem Eisen auf. Die Assoziationskonstante von Lactoferrin beträgt 10^{36} , so daß die Konzentration von freiem Eisen in den Körperflüssigkeiten nur 10^{-18} M beträgt (Bullen, 1981). Dieses stellt einen effektiven Abwehrmechanismus gegen eindringende Bakterien dar, da die meisten Bakterien zum Wachstum eine Konzentration von ca. 10^{-6} M Eisen benötigen (Bullen *et al.*, 1978). Demnach müssen Bakterien, um Eisen aus dem normalen Gewebe zu erhalten, Strukturen aufweisen, die entweder eine höhere Affinität zu Eisen wie das Transferrin und Lactoferrin haben (Weinberg, 1978), oder Strukturen mit denen sie eisenbindende Proteine degradieren können und somit die Affinität zu dem gebundenen Eisen herabsetzen. Eindrucksvolle Untersuchungen bei *Yersinia enterocolitica* zeigten, daß ein Stamm, der keine hochaffinen Eisenbindungsstrukturen aufweist, nur durch die Zugabe von freiem Eisen seine LD₅₀-Rate von mehr als 10^8 auf weniger als 10 Bakterien verringerte (Robins-Browne und Prpic, 1985). Die Fähigkeit der Eisenaufnahme unter eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen ist ein Virulenzmechanismus verschiedener Gram-negativer und Gram-positiver bakterieller Pathogene (Genco *et al.*, 1991; Payne, 1988 und 1993). Viele Mikroorganismen produzieren hochaffine Eisenchelatoren, die ein geringes Molekulargewicht aufweisen, sogenannte Siderophore. Das zur Zeit meist untersuchte Beispiel hierfür ist Aerobactin bei *Escherichia coli* (Bagg und Neilands, 1987; Crosa, 1992). Beispiele bei Gram-positiven Bakterien sind *Mycobacterium smegmatis* (Macham *et al.* 1977), *Corynebacterium diphtheriae* (Russell *et al.* 1984) und *Bacillus subtilis* (Schneider und Hantke, 1993). Allerdings konnten bei einigen Bakterienarten - Gram-negativ wie Gram-positiv - keine Siderophore nachgewiesen werden: *Bordetella pertussis* (Redhead, *et al.* 1987); *Neisseria* spp. (Simonson *et al.*, 1982); *Helicobacter pylori* (Husson *et al.*, 1993); *Moraxella catarrhalis* (Campagnari, 1994); *Streptococcus mutans* (Evans *et al.*, 1986); *Listeria monocytogenes* (Adams *et al.*, 1990) und *Streptococcus pneumoniae* (Tai *et al.*, 1993). Untersuchungen bei *S. pneumoniae* ergaben, daß Pneumokokken Hämin und Hämoglobin als einzige Eisenquelle nutzen können und ein 43 kDa Protein wurde als das Hämin-bindende Protein identifiziert (Tai *et al.*, 1993, Tai *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine Mutante, die einen Defekt in der Hämin-Nutzung aufweist, weniger virulent im Mausmodell war als der Pneumokokken-wildtyp (Tai

et al., 1993). Dieses belegt, daß die Bindung von eisenbindenden Proteinen als Virulenzfaktor anzusehen ist.

In mukösen Sekreten ist Lactoferrin das Eisenbindungsprotein mit der höchsten Konzentration und es sollte die Bindung von humanem Lactoferrin an *S. pneumoniae* untersucht werden. Es konnte zunächst mittels Western-Blot Analysen gezeigt werden, daß 92% der untersuchten Pneumokokken in der Lage waren, humanes Lactoferrin zu binden. In anschließenden kinetischen Bindungsstudien mit radioaktiv-markiertem Lactoferrin banden 94% hLf. Die im Western-Blot nicht reagierenden Stämme stimmten nicht mit denen im Bindungsversuch überein und es konnte keine Korrelation zwischen dem Serotyp und der Bindungsstärke nachgewiesen werden (*Abb.14*).

Weitere Versuche zeigten, daß die Bindung von Lactoferrin humanspezifisch ist, da bovines Lactoferrin nicht gebunden werden konnte und bLf auch die Bindung von humanem Lf nicht inhibieren konnte. Dieses entspricht der Beobachtung, daß es sich bei Pneumokokken um ausschließlich humanpathogene Erreger handelt. Ähnliches wurde auch bei *Neisserien* und *Haemophilus influenzae* beobachtet, die nur humanes Transferrin bzw. Transferrin von Primaten, sowie humanes Lactoferrin banden (Gray-Owen und Schryvers, 1996). Bei der Bestimmung der Bindungsaffinität von Pneumokokken gegenüber hLf konnte mittels der Darstellung nach Scatchard gezeigt werden, daß zwei unterschiedliche Bindungsstellen auf der bakteriellen Oberfläche an der Interaktion beteiligt sind. Diese Bindungsstellen wiesen verschiedene Bindungskonstanten auf. Ähnliches konnte bisher von Asien *et al.* (1978) bei der Bindung von Transferrin an *Neisseria meningitidis* beobachtet werden. Lactoferrin ähnelt in Größe und Struktur stark der von Transferrin, so daß Lactoferrin auch als Mitglied der Transferrin-Familie diskutiert wird (Metz Boutigue *et al.*, 1984). Die Beobachtungen bei der Bindung von Transferrin könnten somit auch auf die Bindung von Lactoferrin übertragbar sein. Transferrin besitzt zwei ähnliche, aber nicht identische Eisenbindungsstellen in verschiedenen Domänen mit verschiedenen Bindungskonstanten. Diese Bindungsstellen befinden sich jeweils in der globulären Schlaufe des C-, sowie des N-terminalen Bereichs (Asien *et al.*, 1978). Für *Staphylococcus epidermidis* konnte gezeigt werden, daß Transferrin zunächst über den N-lobe gebunden wird und die Eisenaufnahme auch zunächst vom N-lobe und dann vom C-lobe erfolgt (Modun *et al.*, 1998). Für *Neisseria meningitidis* und weitere Bakterien konnte die primäre Tf-Bindung in der globulären Schlaufe des C-Terminus nachgewiesen werden (Yu, 1993; Gray-Owen und Schryvers, 1996). Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten lassen sich damit erklären, daß beim Transferrin eine Eisenbindungsstelle

nahe der Oberfläche ist, während die andere im Proteininneren versteckt ist (Yeha und Meares, 1980) und erst durch die Bindung des Proteins eine Konformationsänderung erfolgt, bei der die zweite Bindungsstelle frei zugänglich wird (Kretchmar und Raymond, 1986).

Bei Neisserien konnten zwei unterschiedliche Lactoferrinbindungsproteine - LbpA und LbpB - identifiziert werden (Pettersen *et al.*, 1994 und 1998). Ein nicht-linearer Scatchard hatte auch bei *Staphylococcus aureus* auf zwei Lactoferrin-bindende Proteine und einen niedrig- und einen hochaffinen Bindungsmechanismus hingewiesen. Es konnten zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 62 und 67 kDa charakterisiert werden, die Lactoferrin banden (Trivier und Courcol, 1996). Die Western-Blot Analyse der Lactoferrinbindung bei einigen Pneumo-kokkenstämmen ergab 2 (Sp21) bzw. 3 (Sp105 und Sp109) Lf-bindende Proteine (Abb. 15), wobei das mit ca. 180 kDa hochmolekulare Lactoferrin-bindende Protein dem dimeren Komplex von PspA entspricht, der bereits von Talkington *et al.* (1992) beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, das Lactoferrin-bindende Protein bei *S. pneumoniae* zu identifizieren. Es handelte sich um das 'pneumococcal surface protein A' - PspA (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß durch die Zugabe von aufgereinigtem PspA die Lactoferrinbindung kompetitiv inhibiert wurde. Gleichzeitig konnte mit einer Affinitätschromatographie das hLf-bindende Protein aufgereinigt werden. Die anschließende Sequenzierung interner Peptide und Homologievergleiche mit Proteindaten-banken ergab, daß es sich bei dem hLf-bindenden Protein um PspA handelte. Somit konnte bewiesen werden, daß es sich bei PspA um das hauptsächlich für die Lactoferrin-Bindung verantwortliche Protein handelt. Die im Western-Blot beobachteten zusätzlichen Banden Lf-bindender Proteine (bei Sp21, Sp105 und Sp109) lassen sich mit unterschiedlichen PspA-Serotypen erklären. PspA ist im N-terminalen Bereich variabel und die verschiedenen Serotypen von PspA können in 2 verschiedene Familien eingeteilt werden (Hollingshead *et al.*, 2000). Es konnten Stämme charakterisiert werden, die jeweils ein PspA der unterschiedlichen Familien gleichzeitig exprimierten (McDaniel *et al.*, 1997). Für beide PspA-Familien konnte die Bindung von humanem Lactoferrin nachgewiesen werden (Håkansson *et al.*, 2000).

Im Folgenden sollte die Bindungsdomäne für hLf in PspA charakterisiert werden. Zunächst konnte eine Beteiligung der cholinbindenden Repeats ausgeschlossen werden, da SpsA mit nahezu identischen Repeats nicht in der Lage war, hLf zu binden. Weiterhin konnte die Prolin-reiche Region von PspA ausgeschlossen werden, da ein um diese Region verkürztes

Fusionsprotein ebenfalls in der Lage war, hLf zu binden. Zur weiteren Analyse wurde das Verfahren der sog. 'SPOT'-Membran verwendet. Der N-terminale Bereich von PspA wurde in sich überlappende 15er Peptide eingeteilt und auf einer Membran synthetisiert. Es folgte der immunologische Nachweis der Lactoferrin-Bindung. Hierbei ergaben sich mehrere Bereiche, die eine Bindung von hLf zeigten. Über die Klonierung verschiedener PspA-Fusionsproteine und Western-Blot Analysen konnte die Bindungsdomäne von *S. pneumoniae* NCTC 7879 auf den Bereich von Aminosäure 283 bis 319 eingeschränkt werden. Dieses Ergebnis konnte von Håkansson *et al.* (2000) teilweise bestätigt werden, der beim Stamm EF5668 die hLf-Bindungsdomäne auf den Bereich der Aminosäuren 192 bis 287 einschränken konnte. Dieser Bereich von PspA entspricht dem Bereich der Aminosäuren 195 bis 319 beim Stamm NCTC 7978. Dieses Ergebnis im Zusammenhang mit der SPOT-Membran ergab das 15er Peptid 'YFKEGLEKTIAAKKA' von Aminosäure 292 bis 306 als Bindungsmotiv für humanes Lactoferrin. Die Signale der anderen Peptide, die in der SPOT-Membran reagierten, waren demnach unspezifisch. Ähnliche Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Bindungsmotivs für humanes Transferrin konnte bei Meningokokken beobachtet werden. Auch hier zeigte eine SPOT-Membran mehrere Bereiche bzw. Peptide, die Tf banden. Erst Fusionsproteine ermöglichten die Identifizierung einer Bindungsdomäne (Renauld-Mongénie *et al.*, 1997). Die nähere Eingrenzung des Bindungsmotivs unter besonderer Berücksichtigung der Aminosäuren Lysin (K) und Alanin (A), die gehäuft im 15er Bindungspeptid beobachtet wurden, blieb erfolglos. SPOT-Membranen, die 6er Peptide von Lysinen und Alaninen ('AK-Motiv') und Lysinen und alle anderen Aminosäuren außer Alanin ('ZK-Motiv') in verschiedener Anzahl und Kombination aufwiesen, zeigten eine hohe Beteiligung von Lysinen an der unspezifischen Bindung von hLf. Diese unspezifische Bindung von hLf könnte auch eine Erklärung für die beobachtete Komponente mit geringerer Bindungsaffinität in der Scatchard-Analyse sein. In einer Untersuchung von Scatchard-Analysen, die auf zwei Bindungskomponenten hinwiesen, konnte gezeigt werden, daß die falsche Deutung von Scatchard-Analysen in hohem Maße aufgrund unspezifischer Bindungen erfolgte (Nørby *et al.*, 1980). Somit liese sich ebenfalls die restliche Bindungsaktivität der PspA-defizienten Mutante (R6-*pspA*⁻) gegenüber dem Wildtyp R6 erklären.

Bei einigen Bakterienarten wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* und *Moraxella catarrhalis* konnte unter eisenlimitierenden Wachstumsbedingungen eine Steigerung der Expression bestimmter Proteine beobachtet werden, ohne das die Produktion von Siderophoren nachzuweisen war (West, 1985; Simonson *et al.*, 1987;

Redhead *et al.*, 1987, Husson *et al.*, 1993; Campagnari, 1994). Beim Wachstum von *S. pneumoniae* unter eisenlimitierenden Bedingungen, sowie mit Hämin und Hämoglobin als einzige Eisenquellen konnte im Coomassie-gefärbten SDS-Gel kein verändertes Proteinmuster beobachtet werden. Bei der Zugabe von eisengesättigtem Lactoferrin konnte allerdings ein Protein von ca. 80 kDa stark angefärbt werden. Die Annahme, daß es sich bei diesem Protein um das überexprimierte PspA handelte, konnte mittels Western-Blot Analysen nicht bestätigt werden. Die Analyse im Immunoblot zeigte, daß kein anti-PspA gebunden wurde. Das Protein wurde isoliert und die Sequenzierung interner Peptide ergab, daß es sich um humanes Lactoferrin handelte. Da das Lf quantitativ in höheren Mengen vorlag und ein nahezu gleiches Molekulargewicht wie PspA von ca. 80 kDa aufweist, fand eine Inhibition der Bindung von PspA mit anti-PspA-Bindung statt. Desweiteren belegte das Ergebnis, daß die Bindung von hLf an PspA sehr stark sein muß, da hLf aus dem Wachstumsmedium in sehr großen Mengen an der Bakterienoberfläche gebunden wurde und sich im SDS-Gel mit Coomassie anfärben lies (Abb. 26). Ähnliches wurde bereits bei der Bindung von Ovotransferrin an das 77 kDa-Protein von *Bordetella pertussis* beobachtet (Redhead *et al.*, 1987).

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die biologische Funktion der Lactoferrin-Bindung an Pneumokokken bzw. PspA untersucht werden. Bei Lactoferrin handelt es sich um ein eisenbindendes Glykoprotein, daß 1939 in Rindermilch identifiziert wurde (Soerensen und Soerensen, 1939) und zum ersten Mal 1960 aus Rinder-, sowie menschlicher Milch isoliert werden konnte (Johansson, 1960). Spätere Untersuchungen konnten Lactoferrin ebenfalls in weiteren exokrinen Sekretionsflüssigkeiten wie Galle, Bauchspeicheldrüse und im Dünndarm und der Lunge nachweisen. Lactoferrin kommt beim Menschen und anderen Säugetieren, außer Hund und Ratte, vor (Masson und Heremans, 1971). Ca. 30% des Eisens in humaner Milch ist an Lactoferrin gebunden (Goldsmith *et al.*, 1982), wobei das Eisen in Form von Fe^{3+} gebunden wird (Anderson *et al.*, 1989). Die Konzentration von Lactoferrin im Colostrum beträgt 5-7 mg/ml (Masson und Heremans, 1971), in normaler Milch 1-2 mg/ml (Hennart *et al.*, 1991) und in bronchialen Sekreten ca. $35,2 \pm 6,5$ µg/ml (Fahy *et al.*, 1993). Im Vergleich dazu wird die Konzentration an humanem Lactoferrin im Serum mit $0,307 \pm 0,066$ µg/ml angegeben (Hetherington *et al.*, 1983). Humanes Lactoferrin ist ein Protein aus 703 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Es enthält ca. 7.0% Zuckeranteil in Form von 6 Zuckerketten pro Molekül (Matsumoto *et al.*, 1982). Holo-Lactoferrin - die eisengesättigte Form des Lactoferrins - besteht aus einer

Polypeptidkette, die zwei globuläre Ausbuchtungen (C- und N-lobe) mit jeweils einer Eisenbindungsstelle aufweist (Querinjean *et al.*, 1971). Im Gegensatz zum Apo-Lactoferrin kann die Holo-Form entweder nur ein Eisenkation oder zwei gebunden haben. Bisher konnten drei Isoformen von humanem Lactoferrin isoliert werden: α , β und γ . Das β - und γ -hLf weisen eine RNase-Aktivität, aber keine Eisenbindung auf (Furmanski *et al.*, 1989). Rezeptoren für Lactoferrin werden auf verschiedenen menschlichen Zellen wie Darmzellen, Makrophagen, Neutrophile, Lymphocyten, Blutplättchen und auf verschiedenen Bakterien gefunden. Die mögliche biologische Rolle für Lactoferrin umfaßt ein weites Spektrum und wird hinsichtlich der verschiedenen Isoformen diskutiert. Eine früh untersuchte Funktion beinhaltet die Kontrolle der Verfügbarkeit an freiem Eisen im Körper. Hinsichtlich der Pathogenität hat hLf einen bakteriostatischen Effekt, da kein freiverfügbares Eisen zum Wachstum vorliegt (Arnold *et al.*, 1977; Bullen und Griffiths, 1987; Weinberg, 1984). Neuere Studien über Lf untersuchen die Fähigkeit der Regulation der Immunantwort (Levay und Viljoen, 1995). Da Lactoferrin die Anheftung und Aggregation von PMN an Endothelzellen vermittelt, wird dadurch die inflammatorische Immunantwort amplifiziert. Außerdem stimuliert Lactoferrin die phagozytische und zytotoxische Wirkung von Makrophagen und reguliert die Myelopoese, indem es die Rückkopplung des 'granulocyte-monocyte colony-stimulating factor' inhibiert (Birgins, 1984). Ebenfalls wird eine Regulation der Immunantwort über den Mechanismus der direkten DNA-Bindung diskutiert (Fleet, 1995). Es existieren viele umfangreiche Studien, die sich mit dem bakteriostatischen Effekt von Lactoferrin bei vielen Mikroorganismen befassen, doch bereits 1977 (Arnold *et al.*, 1977) wurden Bakterien beobachtet, die wiederum ein Mechanismus entwickelt haben, das Eisen aus Transferrin bzw. Lactoferrin herauszulösen und es somit zum Wachstum verwenden können. Dieser Mechanismus wurde bisher beschrieben für: *Aeromonas* spp. (Ascencio, 1992; Chart und Trust, 1983), *Bordetella pertussis* (Redhead, *et al.* 1987; Menozzi *et al.*, 1991), *Haemophilus* spp. (Schryvers, 1988), *Helicobacter pylori* (Husson, 1993; Dhaenssens *et al.*, 1997), *Moraxella catarrhalis* (Aebi, 1996; Du, R.-P. *et al.*, 1998), *Mycoplasma* spp. (Tryon und Baseman, 1987), *Neisseria* spp. (Mickelsen, 1982; Schryvers und Morris, 1988; Biswas und Sparling, 1995; Pettersson, 1998), *Prevotella* spp. (Kalfas 1991; de Lillo und Fierro, 1997), *Treponema* spp. (Staggs *et al.*, 1994), *Staphylococcus aureus* (Naidu *et al.*, 1992), *Shigella flexneri* (Tigyi *et al.*, 1992), *Streptococcus mutans* (Lassiter *et al.*, 1987) und *Streptococcus uberis* (Jiang *et al.*, 1998).

Für *S. pneumoniae* konnte nachgewiesen werden, daß sie eisengesättigtes humanes Lactoferrin als einzige Eisenquelle zum Wachstum verwenden können. Es wurde ein von der

hLf-Konzentration abhängiges Wachstum beobachtet und 50 μM hLf waren nötig, um den wachstumslimitierenden Effekt des Eisenchelators EDDHA vollständig auszugleichen. Bei 50 μM hLf entsprach der Kurvenverlauf der Wachstumskurve im normalen THY-Medium. Die Konzentrationen, die in normalen mukösen Sekreten vorzufinden sind, sind um das 100-fache geringer und werden mit 0,5 μM angegeben (Fahy et al., 1993). Allerdings ist Lactoferrin auch als Akut-Phasen-Protein bekannt und wird vermehrt während einer Entzündungsreaktion von polymorphnukleären Neutrophilen abgegeben (Bullen und Armstrong, 1979; Weinberg, 1993), so daß die dabei erreichten Konzentrationen denen der Wachstumsversuche entsprechen könnten. Das Ergebnis, daß Pneumokokken Lactoferrin als Eisenquelle verwerten können, widerspricht der Beobachtung von Tai *et al.* (1993). Da in der Veröffentlichung die Konzentration des zugegebenen Lactoferrins mit 60 μg nur unvollständig angegeben ist, kann keine Aussage über eine evtl. zu geringe Menge gemacht werden. Desweiteren verwendete Tai *et al.* für seine Wachstumsversuche zwei Laborstämme. Es wurde daher angenommen, daß vor allem die Isolate aus dem Nasopharynx in der Lage sind, humanes Lactoferrin als Eisenquelle zu nutzen und diese Fähigkeit beim Vorhandensein anderer Eisenquellen oder Übertritt in die Blutbahn verloren geht. Dieses Phänomen ist bereits bei Neisserien dokumentiert. Nahezu alle Meningokokken, jedoch nur ca. 50 % der Gonokokken und 25 % der Kommensalen Neisserien können Lf als Eisenquelle nutzen. Die Organismen, die kein Lf nutzen können und trotzdem auf mukosalen Oberflächen überleben und sich vermehren, nutzen Häm als Eisenquelle, das bei der Zerstörung von Epithelzellen frei wird (Mickelsen *et al.*, 1982). In dem Wachstumsversuch mit einem Blutisolat konnte zwar ein vermindertes Wachstum mit Lactoferrin als Eisenquelle gegenüber dem in THY-Medium beobachtet werden, allerdings wies dieser Stamm auch mit Hämin ein deutlich geringeres Wachstum gegenüber THY auf. Da auch ein NTCT-Stamm der Pneumokokken mit hLf wuchs, konnte die Annahme einer Phasenvariation bezüglich der Nutzung von Lactoferrin nicht bestätigt werden. Dieses entspricht der Beobachtung, daß sich PspA auch bei 98% der Blutisolate nachweisen lies (Fonseca *et al.*, 2001).

Eine Ausnahme hiervon war der Stamm NTCT 7978, der kein Wachstum mit hLf aufwies, obwohl Western-Blot Analysen zeigten, daß Lactoferrin gebunden wurde.

Mit der Konstruktion einer PspA-defizienten Mutante sollte bewiesen werden, daß PspA für die Bindung und Nutzung von Lactoferrin essentiell ist. Mit der Methode der Insertions-Duplikationsmutagenese wurde vom Wildtyp R6 die Mutante R6-*pspA*⁻ kloniert, die ein verkürztes PspA-Protein von Aminosäure 1 bis 167 exprimierte. Mit Western-Blot Analysen

konnte bestätigt werden, daß R6-*pspA*⁻ kein Lactoferrin mehr binden konnte. Allerdings konnte die PspA-Mutante weiterhin eisengesättigtes humanes Lactoferrin als einzige Eisenquelle zum Wachstum verwenden und im Vergleich zum Wildtyp konnte sogar ein verstärktes Wachstum beobachtet werden. Demnach können Pneumokokken das Eisen aus Lactoferrin herauslösen ohne daß eine vorherige Bindung stattgefunden haben muß. Ähnliches wurde bereits bei verschiedenen Stämmen von *Bacteroides* (Carlsson *et al.*, 1984; Alugupalli und Kalfas, 1996) und *Vibrio cholera* (Ascencio *et al.*, 1992) beobachtet. Diese Stämme konnten Lactoferrin proteolytisch spalten und somit die Konformation der Eisenbindungsstelle zerstören. Da eine Konformationsänderung bei 37°C zur Freisetzung des Eisens führt, konnte bisher bei Transferrin nachgewiesen werden (Makey und Seal, 1976; Kretchmar und Raymond, 1986). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der α -helicale Linker zwischen den globulären Schlaufen des C- und des N-terminalen Bereichs des Lactoferrins sensitiv gegenüber proteo-lytischer Spaltung ist (Anderson *et al.*, 1987). Dieser Mechanismus konnte mit einem sog. 'Fest-Phasen-Protease-Versuch' bestätigt werden. Hierbei wurde radioaktiv-markiertes Lacto-ferrin immobilisiert und nach der Inkubation mit verschiedenen Pneumokokkenstämmen konnte abgespaltene Aktivität im Überstand nachgewiesen werden. R6-*pspA*⁻ wies gegenüber dem Wildtyp sogar eine bis zu 8-fach erhöhte proteolytische Aktivität auf. Somit wird mehr Eisen pro Zeitintervall vom Lactoferrin freigesetzt und ein verstärktes Wachstum von R6-*pspA*⁻ ist zu beobachten. Der Grund für die verstärkte Proteolyse könnte zum einen sein, daß das verkürzte PspA-Fragment in höheren Konzentrationen gebildet wird. Bei dem Fragment sind die cholinbindenden Repeats deletiert, so daß es sekretiert wird. Bereits für LytA und PspA von *S. pneumoniae* sowie für die Glukosyltransferase von *S. gordonii* konnte gezeigt werden, daß eine Deletion der Repeats zur Sekretion führte (McDaniel *et al.*, 1987; Yother *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1994; Vickerman *et al.*, 1996). Durch die Sekretion des Proteins fehlt der Zelle das Signal, daß genügend Protein synthetisiert wurde und es könnte zu einer verstärkten Produktion kommen. Ebenfalls ist eine Konformationsänderung des verkürzten PspA-Proteins denkbar, das einen Vorteil bei der proteolytischen Spaltung aufweist. Eine andere Erklärungs-möglichkeit des erhöhten Wachstums von R6-*pspA*⁻ ist, daß durch den Wegfall der Lf-Bindung die proteolytische Spaltung schneller erfolgen kann und damit mehr Lf in der gleichen Zeit gespalten wird. Damit wäre die Bindung des Lactoferrins der zeitlimitierende Faktor beim Wachstum von Pneumokokken mit Lf als einzige Eisenquelle.

Bei *Vibrio cholerae* konnte gezeigt werden, daß die non-O1 Protease für die proteolytische Spaltung von Lactoferrin verantwortlich ist (Toma, 1996). Bei *S. pneumoniae* konnte durch die aufgereinigten PspA-Fragmente QP2 und QP3 in dem 'Fest-Phasen-Protease-Versuch' nachgewiesen werden, daß PspA für die Proteolyse von hLf verantwortlich ist. Die Ergebnisse des 'Fest-Phasen-Protease-Versuchs' von R6-*pspA*⁻ (PspA-Fragment von Aminosäure 1 bis 167), sowie von QP3 (PspA-Fragment von Aminosäure 105 bis 282) zeigten, daß sich die Domäne der proteolytischen Aktivität auf den Bereich der Aminosäuren 105 bis 167 einschränken läßt. Mit radioaktiv-markiertem Lactoferrin konnten 3 Fragmente als Spaltprodukte mit einer Größe von ca. 36 kDa, 30 kDa und 15 kDa erhalten werden. Dieses entspricht der Gesamtgröße von Lactoferrin mit ca. 80 kDa. Bei verschiedenen Stämmen von *Porphyromonas gingivalis* konnten unterschiedliche Fragmente nach der Proteolyse von Lactoferrin beobachtet werden, wobei alle ein Fragment von ca. 38 kDa aufwiesen (Alugupalli und Kalfas, 1996). Bei *Vibrio cholera* wurden nach Proteolyse des Lactoferrins zwei Fragmente mit einer Größe von 37 und 55 kDa beobachtet (Finkelstein *et al.*, 1983). Ein Vergleich der Intensität der Lactoferrinfragmente nach der proteolytischen Spaltung bei R6-*pspA*⁻ und dem Wildtyp, bestätigt das Ergebnis, daß R6-*pspA*⁻ Lactoferrin verstärkt abbauen konnte. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß beim Stamm NCTC 7978 keine Proteolyse des immobilisierten oder löslichen Lactoferrins erfolgte. Die fehlende Proteolyse ist demnach dafür verantwortlich, daß der Stamm trotz der Bindung von Lactoferrin dieses nicht als Eisenquelle nutzen konnte. Der Sequenzvergleich der Proteolysedomäne von PspA des Stammes NCTC 7978 mit dem Referenzstamm weist einen Austausch von 6 Aminosäuren über den Bereich von 10 Aminosäuren auf. Zur Auswertung der Aminosäureaustausche ist zu beachten, daß Aminosäuren mit basischen oder ungeladenen, polaren Seitenketten relativ hydrophil sind und sich in einem Protein meist nach außen richten (+). Im Gegensatz dazu sind die Seitenketten mit unpolaren Aminosäuren relativ hydrophob und daher im Protein meist nach innen gerichtet (-). Bei dem Vergleich der ausgetauschten Aminosäuren ergibt sich nun für die Bereiche ein unterschiedliches Hydrophilietätsmuster, das zu einer veränderten Proteinfaltung und damit zum Verlust der proteolytischen Aktivität von PspA gegenüber humanem Lactoferrin führen kann. Ein Modell der Eisenfreisetzung von Lactoferrin bei *S. pneumoniae* ist in Abb.45 dargestellt.

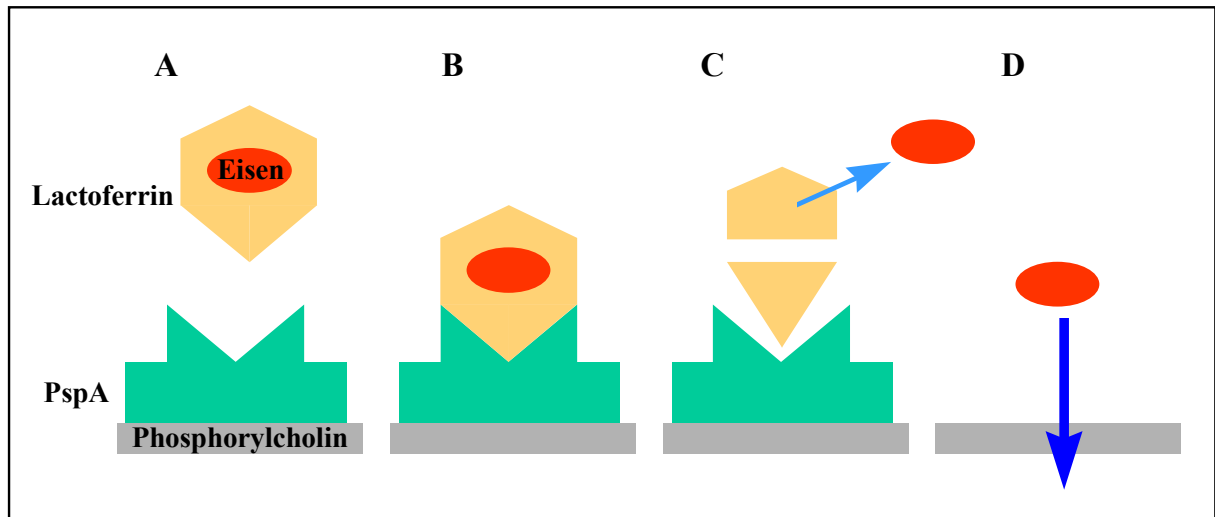


Abbildung 45: Hypothetisches Modell der Eisenfreisetzung aus humanem Lactoferrin bei *S. pneumoniae*. **A:** freies eisengesättigtes humanes Lactoferrin befindet sich im Kulturmedium von *S. pneumoniae*, die PspA auf ihrer Oberfläche an das Phosphorylcholin der Lipoteichonsäuren gebunden haben. **B:** humanes Lactoferrin wird von PspA gebunden. **C:** es erfolgt eine Proteolyse von humanem Lactoferrin, die eine Konformationsänderung des Lactoferrins und damit eine Eisenfreisetzung bewirkt. **D:** freies Eisen wird durch einen bisher nicht identifizierten Mechanismus in die Zelle aufgenommen.

Bei Neisserien konnte ebenfalls beobachtet werden, daß ein Stamm, der nicht der Lage war, Eisen von Lactoferrin zu erhalten, sich auch nicht in der Gegenwart von Lf multiplizieren konnte (Mickelsen *et al.*, 1982). Für Transferrin konnte bei Neisserien gezeigt werden, daß die Bindung von Tf unabhängig von der Fähigkeit ist, Eisen von Tf zu erhalten. *Neisseria meningitidis* band in einem eisengesättigtem Medium die gleiche Anzahl an Tf-Molekülen wie unter eisenlimitierenden Bedingungen (Simonson *et al.*, 1982). Übertragen auf Lactoferrin entspricht dieses den Ergebnissen von NCTC 7978. Für die weitere Aufnahme des Eisens von humanem Lactoferrin in die Bakterienzelle existiert für Neisserien ein Modell, bei dem *Neisseria gonorrhoeae* zwar getrennte Rezeptoren für hLf und hTf exprimiert, aber die Eisenaufnahme von diesen beiden Eisenbindungsproteinen durch die gemeinsame Nutzung eines weiteren Proteins gekoppelt ist. Diese Komponente ist essentiell nur für die Eisenaufnahme von Lf und Tf und nicht von anderen Eisenquellen verantwortlich (Blanton *et al.*, 1990). Für *Bordetella bronchiseptica* konnte eine Beteiligung des Siderophors bei der Eisenaufnahme von Lactoferrin nachgewiesen werden, da die Siderophoren-defiziente Mutante Lactoferrin nicht mehr als Eisenquelle zum Wachstum verwenden konnte (Foster und Foster, 1993). Da Gram-positive Bakterien keine äußere Membran aufweisen, muß die Selektion für Eisenquellen an der cytoplasmatischen Seite stattfinden. Hier ist die Spezifität geringer als bei der äußeren Membran bei Gram-negativen Bakterien. Ein Beispiel hierfür ist *E. coli* K-123, der für verschiedene Eisenkatechole ein einziges Transportsystem durch die

innere Membran, aber verschiedene substratspezifische Rezeptoren in der äußeren Membran aufweist. Der Transport durch die zytoplasmatische Membran erfolgt immer über ein periplasmatisches Bindungsprotein, das bei Gram-positiven, die kein Periplasma haben, an der Außenseite der zytoplasmatischen Membran über ein Lipoprotein gebunden ist (Actis *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1998). Bei der Eisenaufnahme über Siderophoren ist es wahrscheinlich, daß das Eisen ohne den Chelator in das Zytoplasma gelangt. Es wird angenommen, daß das Fe^{3+} von den Siderophoren abgespalten und zu Fe^{2+} reduziert wird, da die Bindungskonstante für Fe^{2+} um einige Magnituden unter der von Fe^{3+} liegt (Braun, *et al.*, 1998). Ein Transport von Eisen ins Zytoplasma mittels Porine, die ein Ausschlußvolumen von ca. 600 Da haben, konnte bisher nur bei *Shigella flexneri* beobachtet werden (Nikaido, 1996). Shigellen binden Lactoferrin an ein Protein der äußeren Membran, das mit anti-PoI-Antikörpern, die spezifisch Porine der Enterobacteriaceae erkennen, reagierte. Demnach ist das Lf-bindende Protein ein Porin (Tigyi, 1992). Bei *S. pneumoniae* konnte bisher nur ein sogenannter 'ABC-Transporter' für die Eisenaufnahme von Hämoglobin charakterisiert werden (Brown *et al.*, 2001).

Zur Identifizierung der Komponenten, die bei Pneumokokken am Eisentransport bzw. der Aufnahme von Eisen vom Lactoferrin beteiligt sind, ist die Verwendung von radioaktiv-markiertem Eisen (^{59}Fe) beim Wachstum eine Möglichkeit. Nach erfolgreicher Isolierung und Charakterisierung der Komponenten kann eine systematische Mutagenese deren genaue Funktion bzw. die funktionalen Domänen identifizieren. Die Isolierung des gesamten Eisentransportsystems und die Rekonstitution in einer künstlichen Lipid-Doppelmembran, wie es bei dem Maltose- und Histidintransportsystem bereits durchgeführt wurde, würde eine genaue *in vitro*-Untersuchung der einzelnen Komponenten und ihr Zusammenspiel erlauben.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Funktion für das bereits 1988 identifizierte PspA nachgewiesen werden - PspA bindet humanes Lactoferrin und kann eisen-gesättigtes Lactoferrin zum Wachstum verwenden, indem es Lactoferrin proteolytisch spaltet. Aufgrund des essentiellen Charakters der Eisenaquisition konnte somit PspA als Impfstoffkandidat bestätigt werden. Bislang wird bei der Impfung gegen *S. pneumoniae* ein Polysaccharidimpfstoff verwendet, der sich aus 23 verschiedenen Polysacchariden zusammensetzt. Allerdings konnten bisher bei Pneumokokken 90 mögliche Serotypen identifiziert werden, so daß die Kopplung der 23 häufigsten Typen keinen absoluten Impfschutz bietet. Eine weitere Problematik von Pneumovax[®] ergibt sich aus dem Polysaccharidcharakter, der zwar einen langanhaltenden Antikörperspiegel bewirkt, jedoch auf IgM und IgG2 beschränkt bleibt. Da sich die Klasse der Immunglobuline G2 erst im Alter

von 2 Jahren entwickelt, ist der Impfstoff ebenfalls bei Kleinkindern, die eine der Hauptrisikogruppen sind, unwirksam (Cowan *et al.*, 1978). Aufgrund der allgemein geringeren Serokonversion von Proteinen und der T-Zell-abhängigen Immunantwort, sind Proteine demnach besser als Impfstoffkandidaten geeignet. Zu den bisher am Besten untersuchten Proteinen gehört das PspA. Seit 1992 ist bekannt daß das Serum von fast allen Erwachsenen und vielen Kindern Antikörper gegen PspA aufweisen. Dieses entspricht der natürlichen Exposition von PspA bei *S. pneumoniae* (Crain *et al.*, 1990). Mit einer aktiven Immunisierung könnte evtl. ein höherer Antikörpertiter und damit Schutz vor einer Pneumokokkeninfektion erreicht werden. Im Mausmodell konnte für PspA gezeigt werden, daß es eine protektive Immunantwort auslösen kann (McDaniel *et al.*, 1984 und 1990). Weitere Untersuchungen zeigten, daß eine intranasale Immunisierung mit PspA einen intranasalen Karrierestatuts, sowie eine pulmonale Infektion und Sepsis verhindern konnte (Wu *et al.*, 1997). Protektivität konnte ebenfalls über die orale Immunisierung mit PspA-exprimierenden Salmonellen (Nayak *et al.*, 1998), sowie der DNA-Immunisierung erreicht werden (McDaniel *et al.*, 1997).

Obwohl Proteinsequenzen im allgemeinen stärker als Polysaccharidstrukturen konserviert sind, ist auch hier das Problem der Antigenvariation bekannt. Die relativ hohe Antigenvariabilität ist mit mehrfachen horizontalen Gentransfer aufgrund der natürlichen Kompetenz der Pneumokokken zu erklären (Whatmore *et al.*, 1997; Briles *et al.*, 1998). Bei PspA sind mehr als 40 verschiedene Serotypen bekannt (Crain *et al.*, 1990; Waltman *et al.*, 1990; Munoz *et al.*, 1992b), die allerdings teilweise eine Kreuz-Protektivität sowohl im Mausmodell, als auch im Menschen aufweisen (Tart *et al.*, 1996; Nabors *et al.*, 2000). Aufgrund der Kreuz-Protektivität müssen bei PspA konservierte Epitope vorliegen, die sich als Impfstoffkandidaten eignen. McDaniel *et al.* (1994) und Briles *et al.* (1996) identifizierten beim Stamm EF5668 die Bereiche der Aminosäuren 1 bis 115 und 192 bis 260 als immunogene PspA-Fragmente, die eine protektive Immunantwort auslösen können. Die homologen Bereich der Sequenz von NCTC 7978 liegen bei Aminosäure 1 bis 112 und bei 195 und 319. Der erste Bereich beinhaltet einen Teil der identifizierten Domäne für die proteolytische Spaltung von hLf, die bei Aminosäure 105 bzw. 102 (McDaniel) beginnt. Bis zu der Aminosäure 115 bzw. 112 ist die Aminosäurenabfolge mit 'VQQAYLAY/QQA' konserviert. Ob diese Sequenz essentiell für die proteolytische Spaltung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft. Der zweite Bereich beinhaltet das Lactoferrin-bindende Peptid, das in der Sequenz von EF5668 von Aminosäure 246 bis 260 lokalisiert ist. Da beide Bereiche bei Pneumokokken essentiell für die Bindung und proteolytische Spaltung von

humanem Lactoferrin sind und die Fähigkeit aufweisen, eine protektive Immunantwort auszulösen, erscheinen diese PspA-Fragmente als geeignete Impfstoffkandidaten. Bei Verwendung eines verkürzten PspA-Proteins als Impfstoff, sowohl als reines Protein, als auch bei der Konstruktion eines Lebendimpfstoffstammes (z.B. von *Salmonella*) oder eines DNA-Impfstoffes sollte dieser Bereich besonders berücksichtigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Actis,L.A., Tolmasky,M.E., Crosa,L.M., and Crosa,J.H.. 1995. Characterization and regulation of the expression of FatB, an iron transport protein encoded by the pJM1 virulence plasmid. *Mol.Microbiol.* 17:197-204.

Aebi,C., Stone,B., Beucher,M., Cope,L.D., Maciver,I., Thomas,S.E., McCracken,G.H. Jr., Sparling,P.F., Hansen,E.J.. 1996. Expression of the CopB outer membrane protein by *Moraxella catarrhalis* is regulated by iron and affects iron acquisition from transferrin and lactoferrin. *Infect.Immun.* 64:2024-2030.

Adams,T.J., Vartivarian,S., and Cowart,R.E.. 1990. Iron acquisition system of *Listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.* 58:2715-2718.

Agrawal,A., Xu,Y., Ansardi,D., Macon,K.J., and Volanakis,J.E.. 1992. Probing the Phosphocholine-binding Site of Human C-reactive Protein by Site-directed Mutagenesis. *JBC* 267:25352-25358.

Alexander,J.E., Lock,R.A., Peeters,C.C., Poolman,J.T., Andrew,P.W., Mitchell,T.J., Hansman,D., and Paton,J.C.. 1994. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 62:5683-5688.

Alloing,G., Trombe,M.C., Claverys,J.P.. 1989. Cloning of the *amiA* locus of *Streptococcus pneumoniae* and identification of its functional limits. *Gene* 76:363-368.

Alonso DeVelasco,E., Verheul,A.F.M., Verhoef,J., Snippe,H.. 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microb.Rev.* 59:591-603.

Alugupalli,K.R., Kalfas,S.. 1996. Degradation of lactoferrin by periodontitis-associated bacteria. *FEMS Microbiol.Lett.* 145:209-14.

Andersson, B., Dahmen, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G., Eden, C.S.. 1983. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J.Exp.Med.* 158:559-570.

Anderson,B.F., Baker,H.M., Dodson,E.J., Norris,G.E., Rumball,S.V., Waters,J.M., Baker,E.N.. 1987. Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:1769-1773.

Anderson,B.F., Baker,H.M., Norris,G.E., Rice,D.W., and Baker,E.N.. 1989. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 209:711-734.

- Anttila,M., Eskola,J., Ahman,H., Käyhty,H.. 1998.** Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* Type 6B and 23F Polysaccharides in Infants Primed with Pneumococcal Conjugates and Boosted with Polysaccharide or Conjugate Vaccines. J.Infect.Dis. 177:1614-1621.
- Appelbaum,P.C.. 1992.** Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. An overview. Clin.Inf.Dis. 15:77-83.
- Arnold,R.R., Cole, M.F., McGhee,A..1977.** Bactericidal effect for human lactoferrin. Science 197:263-265.
- Ascencio,F., Ljungh,A., and Wadstrom,T.. 1991.** Comparative study of extracellular matrix protein binding to *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish and human infection. Microbios. 65:135-146.
- Ascencio,F., Ljungh,A., Wadstrom,T.. 1992.** Lactoferrin binding properties of *Vibrio cholerae*. Microbios. 70:103-117.
- Ascencio,F., Ljungh,A., and Wadstrom,T.. 1992.** Characterization of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. Appl.Env.Microbiol. 58:42-47.
- Asien,P., Leibman,A., Zweier,J.. 1978.** Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. J.Biol.Chem. 252:1930-1937.
- Austrian,R.. 1978.** Pneumococcal-type surveillance and the composition of pneumococcal vaccines. In Pathogenic Streptococci - Proceedings of the VIIth International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, reedbooks, Surrey, USA, Seiten:187-188.
- Austrian,R.. 1984.** Penumococcal infections. In Germanier,R. (ed.), Bacterial vaccines. Academic Press, London, Seite 257-288.
- Austrian,R.. 1986.** Some aspects of the pneumococcal carrier state. J.Antimicrob.Chemotherapy 18:35-45.
- Austrian, R.. 1999.** The pneumococcus at the millennium: not down, not out. J.Infect.Dis. 179:338-441.
- Ausubel,F.M.. 1989.** Current Protocols in Molecular Microbiology. Wiley, New York.
- Avery,O., Dubois,R.. 1931.** The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcal infection in mice. J.Exp.Med. 54:73-89.
- Avery,O., Macleod,C.M., McCarthy,M.. 1931.** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal serotypes. J.Exp.Med. 79:137-157.
- Bagg,A., and Neilands,J.B.. 1987.** Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. Microbiol.Rev. 51:509-518.
- Banas,J.A., Russel,R.R.B., Ferretti,J.J.. 1990.** Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. Infect.Immun. 58:667-673.

- Baquero,F., Martinez-Beltran,J., Loza,E.. 1991.** A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J.Antimicrob.Chemother. 28:31-38.
- Barletta,R.G., Michalek,S.M., Curtiss 3rd,R.. 1988.** Analysis of the virulence of *Streptococcus mutans* serotype c *gtfA* mutants in the rat model system. Infect.Immun. 56:322-330.
- Bergmann,S., Rohde,M., Chhatwal,G.S., Hammerschmidt,S.. 2001.** α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. MolecularMicrobiology 40:1273-1287.
- Bethe,G.. 1998.** Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Lactoferrin-Bindungs-Aktivität von *Streptococcus pneumoniae*. Diplomarbeit, eingereicht in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina in Braunschweig.
- Berry,A.M., Paton,J.C., Glare,E.M., Hansman,D., Catcheside,D.E.A.. 1988.** Cloning and expression of the pneumococcal neuraminidase gene in *E.coli*. Gene 71:299-305.
- Berry,A.M., Lock,R.A., Hansman,D., Paton,J.C.. 1989.** Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 57:2324-2330.
- Berry,A.M., Lock,R.A., Thomas,S.M., Rajan,D.P., Hansman,D., Paton,J.C.. 1994.** Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. Infect.Immun. 62:1101-1108.
- Berry,A.M., Lock,R.A., Paton,J.C..1996.** Cloning and nucleotide sequence of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 178:4854-4860.
- Berry,A.M., Paton,J.C..1996.** Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 64:5255-5262.
- Berry,A.M., Paton,J.C..2000.** Additive Attenuation of Virulence of *Streptococcus pneumoniae* by Mutation of the Genes Encoding Pneumolysin and Other Putative Pneumococcal Virulence Proteins. Infect.Immun. 68:133-140.
- Breukels,M.A., Rijkers,G.T., Voorhorst-Ogink,M.M., Zegers,B.J., Sanders,L.A.. 1999.** Pneumococcal conjugate vaccine primes for polysaccharide-inducible IgG2 antibody response in children with recurrent otitis media acuta. J.Infect.Dis. 179:1152-1156.
- Birgins,H.S.. 1984.** The biological significance of lactoferrin in haematology. Scand.J.Haematol. 33:225-230.
- Biswas,G.D., Sparling,P.F.. 1995.** Characterization of *lbpA*, the structural gene for a lactoferrin receptor in *Neisseria gonorrhoeae*. Infect.Immun. 63:2958-2967.

- Black,S., Shinefield,H., Fireman,B., Lewis,E., Ray,P., Hansen,J.R., Elvin,L., Ensor,K.M., Hackell,J., Siber,G., Malinoski,F., Madore,D., Chang,I., Kohberger,R., Watson,W., Austrian,R., Edwards,K.. 2000.** Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 19:187-95.
- Blanton, K.J., Biswas,G.D., Tsai,J., Adams,J., Dyer,D.W., Davis,S.M., Koch,S.S., Sen,P.K., Sparling,P.F.. 1990.** Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *J.Bacteriol.* 172:5225-5235.
- Bohr,V., Rasmussen,N., Hansen,B., Gade,A., Kjersem,H., Johsen,N., Paulson,O.. 1985.** Pneumococcal meningitis: an evaluation of prognostic factors in 164 cases based on mortality and on a study of lasting sequelae. *J.Infect.Dis.* 10:143-157.
- Bonnah,R.A., Yu,R.H., Schryvers,A.B.. 1995.** Biochemical analysis of lactoferrin receptors in the Neisseriaceae: identification of a second bacterial lactoferrin receptor protein. *Microb.Pathog.* 19:285-297.
- Bonnah,R.A., Yu,R.H., Wong,H., Schryvers,A.B.. 1998.** Biochemical and immunological properties of lactoferrin binding proteins of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Microb.Pathog.* 24:89-100.
- Böttger,E.C.. 1988.** High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electro-transformation. *Biotechniques* 6:878-880.
- Bornstein,D.L.. 1982.** Leukocytic pyrogen: a major mediator of the acute phase reaction. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 389:323-336.
- Boulnois,G.J., Mitchell,T.J., Saunders,K., Owen,R., Canvin,J., Shepherd,A., Cámara,M., Wilson,R., Feldman,C., Steinfort,C., Bashford,L., Pasternak,C., Andrew,P.W.. 1991.** Analysis of some putative protein virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. In Dunny,G.M., Cleary,P.P., McKay,L.L. (ed.), *Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, p.83-87.
- Boulnois, G.J.. 1992.** Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J.Gen.Microbiol.* 138:249-259.
- Braun,L., Dramsi,S., Dehoux,P., Bierne,H., Lindahl,G., and Cossart,P.. 1997.** InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol.Microbiol.* 25:285-294.
- Braun,V., Hantke, K., and Köster,W.. 1998.** Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. 67-145.
- Breukels,M.A., Rijkers,G.T., Voorhorst-Ogink,M.M., Zegers,B.J., Sanders,L.A.. 1999.** Pneumococcal conjugate vaccine primes for polysaccharide-inducible IgG2 antibody response in children with recurrent otitis media acuta. *J.Infect.Dis.* 179:1152-1156.

- Briese,T., and Hakenbeck,R.. 1985.** Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *J.Biochem.* 146:417-427.
- Briles,D.E., Yother,J., McDaniels,L.S.. 1988.** Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev.Infect.Dis.* 10:372-374.
- Briles,D.E., King,J.D., Gray, M.A., McDaniels,L.S., Swiatlo,E., Benton, K.A.. 1996.** PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine* 14:858-867.
- Briles,D.E., Tart,R.C., Wu,H.Y., Ralph,B.A., Russell,M.W., McDaniel,L.S.. 1996.** Systemic and mucosal protective immunity to pneumococcal surface protein A. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 797:118-126.
- Briles,D.E., Hollingshead,S.K., Swiatlo,E., et al.. 1997.** PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb.Drug Resist.* 3:401-408.
- Briles,D.E., Tart,R.C., Swiatlo,E., et al.. 1998.** Pneumococcal diversity: consideration for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin.Microbiol.Rev.* 11:645-657.
- Briles,D.E., Hollingshead,S.K., Swiatlo,E., et al..** Immunization of humans with rPspA elicits antibodies which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* expressing heterologous PspA molecules. *J.Infect.Dis.* in press.
- Brown,J.H.. 1919.** The use of blood agar for the study of streptococci. New York, The Rockefeller Institute for Medical Research, Monograph No 9:122.
- Bruyn,G.A.W., Zegers,B.J.M, and van Furth,R.. 1992.** Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin.Inf.Dis.* 14:251-262.
- Bullen,J.J., Rogers,H.J., Griffiths.E.. 1978.** Role of iron in bacterial infection. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 80:1-35.
- Bullen,J.J., Armstrong,J.A.. 1981.** The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 36:781-791.
- Bullen,J.J.. 1981.** The significance of iron in infection. *Rev.Inf.Dis.* 3:1127-1138.
- Bullen,J.J., and Griffiths.E.. 1987.** Iron and infection: molecular physiological and clinical aspects. Wiley Interscience, Great Britain.
- Calvin,N.M., Nanawalt,P.C.. 1988.** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J.Bacteriol.* 170:2796-2801.
- Cámara, M., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J.. 1991.** *Streptococcus pneumoniae* produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 59:2856-2858.

- Cámara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., Mitchell, T.J.. 1994.** A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect.Immun.* 62:3688-3695.
- de la Campa,A.G., Garcia,E., Fenoll,A., Munoz,R.. 1997.** Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus:optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb.Drug.Resist.* 3:177-193.
- Campagnari, A.A.** Growth of *Moraxella catarrhalis* with human transferrin and lactoferrin: expression of iron-repressible proteins without siderophore production. *Infect.Immun.* 62:4909-4914, 1994.
- Carlsson,J. , Höfling,J.F., and Sundqvist,G.K.. 1984.** Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented *Bacteroides* species. *J.Med.Microbiol.* 18:39-46.
- Chart,H., and Trust,T.J.. 1983.** Acquisition of iron from *Aeromonas salmonicida*. *J.Bacteriol.* 156:758-764.
- Chen,J.-D., and Morrison,D.A.. 1987.** Cloning of *Streptococcus pneumoniae* DNA fragments in *Escherichia coli* requires vectors protected by strong transcriptional terminators.
- Chudwin,D.S., Artrip,S.G., Korenblit,A., Schiffman,G., Rao,S.. 1985.** Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 50:213-217.
- Cowan,M.J., Ammann,A.J., Wara,D.W., et al.. 1978.** Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children. *Pediatrics* 62:721-727.
- Cowart,R.E., and Foster,B.G.. 1985.** Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J.Infect.Dis.* 151:721-730.
- Crain,M.J., Waltman,W.D.,2d, Turner,J.S., Yother,J., Talkington,D.F., McDaniel,L.S., Gray,B.M., and Briles,D.E.. 1990.** Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 58:3293-3299.
- Crain,M.J., Turner,J.S., Robinson,D.A., Coffey,T.J., Brooks-Walter,A., McDaniel,L.S., Briles,D.E.. 1996.** Evidence for the simultaneous expression of two PspAs by a clone of capsular serotype 6B *Streptococcus pneumoniae*. *Microb.Pathog.* 21:265-275.
- Crosa,J.H.. 1992.** Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol.Rev.* 53:517-530.
- Cundell,D.R., Pearce,B.J., Yuong,A., Tuomanen,E.I., Masure,H.R.. 1994.** Protein dependent peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* mediate cytoadherence to type II lung cells and in human endothelial cells. *J.Cell.Biochem.Suppl.* 18A:45.

- Cundell,D.R., Pearce,B.J., Sandros,J., Naughton,A.M., Masure,H.R.. 1995.** Peptide permeses from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. Infect.Immun. 63:2493-2498.
- Cundell,D.R., Gerard,N.P., Gerard,C., Idanpaan-Heikkila,I., Tuomanen,E.I.. 1995.** Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. Nature 377:435-438.
- Dave,S., Brooks-Walter,A., Pangburn,M.K., McDaniel,L.S.. 2001.** PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. Infect.Immun. 69:3435-3437.
- Degan,R., Isaachson,M., Lang,R., Karpuch,J., Block,C., Amir,J.. 1994.** Epidemiology of pediatric meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* in Israel: a 3-Year nationwide study. J.Infect.Dis. 169:912-916.
- Degan,R., Melamed,R., MuallemM., Piglansky,L., Greenberg,D., Abramson,O., Mendelman,P.M., Bohidar,N., Yagupsky,P.. 1996.** Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. J.Infect.Dis. 174:1271-1278.
- Diaz,E., Lopez,R., Garcia,J.L.. 1992.** Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. J.Bacteriol. 174:5508-5515.
- deLillo,A., Fierro,J.F.. 1997.** Identification of a lactoferrin-binding protein in *Prevotella nigrescens*. FEMS Microbiol.Letters 150:61-64.
- Dhaenens,L., Szczebara,F., Husson,M.O.. 1997.** Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. Infect.Immun. 65:514-518.
- Dintilhac,A., Alloing,G., Granadel,C., Claverys,J.P.. 1997.** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. Mol.Microbiol. 25:727-739.
- Douglas,R.M., Miles,H.B.. 1984.** Vaccination against *Streptococcus pneumoniae* in childhood: lack of demonstrable benefit in young Australian children. J.Infect.Dis. 149:861-869.
- Dove,C.H., Wang,S.-Z., Price,S.B., Phelps,C.J., Lyerly,D.M., Wilkins,T.D., Johnson,J.L.. 1990.** Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. Infect.Immun. 58:480-488.
- Eberhard,T., Kronvall,G., Ullberg,M.. 1999.** Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. Microb.Pathog. 26:175-181.

- Von Eichel-Streiber,C., Sauerborn,M., and Kuramitsu,H.K.. 1992.** Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. J.Bacteriol. 174:6707-6710.
- Emini,E.A., Hughes,J., Perlow,D., Boger,J.. 1985.** Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J.Virology 55:836-839.
- Eskola,J., Käyhty,H., Peltola,H., et al.. 1985.** Antibody levels achieved in infants by course of *H.influenzae* type b polysaccharide/diphtheria toxoid conjugate vaccine. Lancet 1:1184-1186.
- Eskola,J., Takal,A.K., Kela,E. et al.. 1992.** Epidemiology of invasive pneumococcal infections in children in finland. JAMA 268:3323-3327.
- Eskola,J., Kilpi,T., Palmu,A., Jokinen,J., Haapakoski,J., Herva,E., Takala,A., Kayhty,H., Karma,P., Kohberger,R., Siber,G., Makela,P.H.. 2001..** Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. N.Engl.J.Med. 344:403-409.
- Evans,S.L., Arceneaux,J.E.L., Byers,B.R., Martin,M.E., and Aranha,H.. 1986.** Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. J.Bacteriol. 168:1096-1099.
- Fallgreen-Gebauer,E., Gebauer,W., Bastian,A., Kratzin,H.D., Eiffert,H., Zimmermann,B., Karas,M., Hilschmann,N.. 1993.** The covalent linkage of secretory component to IgA. Biol.Chem.Hoppe-Seyler 174:1023-1028.
- Fahy,J.V., Steiger,D.J., Liu,J., Basbaum,C.B., Finkbeiner,W.E., Boushey,H.A.. 1993.** Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. Am.Rev.Resp.Dis. 147:1132-1137.
- Fedson,D.S.. 1988.** Pneumococcal vaccine. In: Plotkin,S.A. and Mortimer,E.A.J. (Eds.): Vaccines. Saunders, Philadelphia, 271-299.
- Ferrante,A., Rowan-Kelly,B., Paton,J.C.. 1984.** Inhibition of *in vitro* human lymphocyte response by the neumococcal toxin pneumolysin. Infect.Immun. 46:585-589.
- Finne,D.P.. 1975.** Pneumococcal type associated variability in alternate complement pathway activation. Infect.Immun. 12:772-778.
- Finne,J., Leinonen,M., Makela,P.H.. 1983.** Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. Lancet. 2:355-7.
- Finne,J., Bitter-Suermann,D., Goridis,C., Finne,U.. 1987.** An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. J.Immunol. 138:4402-7.
- Fischetti,V.A., Pancholi,V., Schneewind,O.. 1990.** Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. Mol.Microbiol. 4:1603-1605.

Fleet,J.D.. 1995. A new role for lactoferrin: DNA-binding and transcription activation. *Nutr.Rev.* 53:226-231.

Van der Flier,M., Chhun,N., Wizemann,T.M., Min,J., McCarthy,J.B., Tuomanen,E.I.. 1995. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized Fibronectin. *Infect.Immun.* 63:4317-4322.

Fonseca,N., Castaneda,E., Di Fabio,J.L., Hollingshead,S.K., Briles,D.E.. 2001. Pneumococcal Surface Protein A of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Colombian Children. *Emerg.Infect.Dis.* 7:828-831.

Forrester,H.L., Jahnigen,D.W., LaForce,F.M.. 1987. Inefficacy of pneumococcal vaccine in a high-risk population. *Am.J.Med.* 83:425-430.

Foster, L.A. and Agiato Foster, L. A 1993. Siderophore production mutant of *Bordetella bronchiseptica* cannot use lactoferrin as an iron source. *Infect.Immun.* 61:2698-2702.

Fox,J.L.. 1999. Vaccines for the 21st Century: a Tool for Decisions-making. Study by the Institute of Medicine (IOM) - Spring 1999. *ASM News.* 7:466-467.

Frank,R.. 1992. Spot-Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-9232.

Frank,R.. 1995. Simultaneous and combinatorial chemical synthesis techniques for the generation and screening of molecular diversity. *J.Biotechnol.* 41:259-272.

Furmanski,P., Li,Z.P., Fortuna,M.B., Swamy,C.V.B., Das,M.R.. 1989. Multiple molecular forms of human lactoferrin. *J.Exp.Med.* 170:415-429.

Garcia,P., Garcia,J.L., Garcia,E., Lopez,R.. 1986. Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gen from its own promotor in *E.coli*. *Gene* 43:265.272.

Garcia,J.L., Garcia,E., Sanchez-Puelles,J.M., Lopez,R.. 1988. Identification of a lytic enzyme of *Clostridium acetobutylicum* that degrades choline-containing pneumococcal cell walls. *FEMS Microbiol.Lett.* 52:133-138.

Garcia,J.L., Diaz,E., Romero,A., Garcia,P.. 1994. Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J.Bacteriol.* 176:4066-4072.

Garcia,J.L., Sanchez-Beato,A.R., Medrano,F.J., and Lopez,R.. 1998. Versatility of choline-binding domain. *Microb.Drug Resist.* 4:25-36.

Garcia-Leonie,M.E., Cercenado,E., Rodeno,P., Bernaldo de Quiros,J.C.L., Martinez-Hernandezet,D., Bouza,E.. 1992. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin: a prospective microbiological and clinical study. *J.Infect.Dis.* 14:427-435.

Geelen, S., Bhattacharyya,C., Tuomanen,E.. 1993. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in humans endothelial cells. *Infect.Immun.* 61:1538-1543.

Genco,C.A., Chen,C., Arko,R.J., Kapczynski,D.R., and Morse,S.A.. 1991. Isolation and characterization of a mutant of *Neisseria gonorrhoeae* that is defective in the uptake of iron from transferrin and haemoglobin and is avirulent in mouse subcutaneous chambers. *J.Gen.Microbiol.* 137:1313-1321.

Gillespie,S.H.. 1989. Aspects of pneumococcal infections including bacterial virulence, host defense and vaccination. *J.Med.Microbiol.* 28:237-248.

Gilson,E., Alloing,G., Schmidt,T., Claverys,J.P. Dudler,R., Hofnung,M.. 1988. Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gam-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *EMBO J.* 7:3971-3974.

Goldsmith,S.J., Eitenmiller,R.R., Barnhart,H.M., Toledo,R.T., Rao,V.N.. Unsaturated iron-binding capacity of human milk. *J.Fd.Sci.* 18:512-515.

Gosink,K.K., Rodgers,M.E., Guglielmo,C., Tuomanen,E.I., and Masure,H.R.. 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 68:5690-5695.

Gotschlich,E.C., Liu,T.Y.. 1967. Structural and immunological studies on the pneumococcal C polysaccharid. *J.Biol.Chem.* 242:463-470.

Gray,B.M., Converse III,G.M., Dillon,H.C.. 1979. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J.Infect.Dis.* 140:979-983.

Gray,B.M., Converse III,G.M., Dillon,H.C.. 1980. Epidemiology studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J.Infect.Dis.* 142:923-933.

Gray-Owen,S.D., et al.. 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* 4:185-191.

Håkansson,A., Roche,H., Mirza,S., McDaniel,L.S., Brooks-Walter,A., Briles,D.E.. 2001. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infect.Immun.* 69:3372-3381.

Hakenbeck,R., Tarpay,M., Tomasz,A.. 1980. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *S. pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 17:364-371.

Halle,E.. 1998. Der Risikopatient mit Atemwegsinfektionen. 39.Kongr.Dt.Ges.Pneum., Leipzig.

Hammerschmidt,S., Talay,S.R., Brandtzaeg,P., Chhatwal,G.S.. 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component. *Mol.Microbiol.* 25:1113-1124.

Hammerschmidt,S., Bethe,G., Remane,P.H., Chhatwal,G.S.. 1999. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 67:1683-1687.

- Hammerschmidt,S., Tillig,M.P., Wolff,S., Vaerman,J.P., Chhatwal,G.S.. 2000.** Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. Mol.Microbiol. 36:726-36.
- Handwerger,S., Tomasz,A.. 1986.** Alterations in penicillin binding proteins of clinical and laboratory isolates of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* with low levels of penicillin resistance. J.Infect.Dis 153:83-89.
- Harrington,D.J.. 1996.** Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease. Infect.Immun. 64:1885-1891.
- Hayrinen,J., Jennings,H., Raff,H., Rougon,G., Hanai,N., Gerardy-Schahn,R., Finne,J.. 1995.** Antibodies to polysialic acid and its N-propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. J.Infect.Dis. 171:1481-90.
- Hennart,P.F., Basseur,D.J., Delogne Desnoeck, J.B., Dramaix,M.M., Robyn,C.E.. 1991.** Lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status and parity of mother. Am.J.Clin.Nutr. 53:32-39.
- Henrichsen,J.. 1995.** Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J.Clin.Microbiol. 33:2759-2762.
- Hershko,C.. 1975.** The fate of circulating haemoglobin. British Journal of Haematology. 29:199-204.
- Hetherington,S.V., Spitznagel,J.K., Quie,P.G.. 1983.** An enzyme-linked immunoassay (ELISA) for measurement of lactoferrin. J.Immunol.Methods 65:183-190.
- Hoepelman,A.I., Tuomanen,E.I.. 1992.** Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. Infect.Immun. 60:1729-1733.
- Hoeprich,P.D., Jordan,M.C., Ronald,A.R., et al.. 1994.** Infectious Diseases. A Treatise of Infectious Process. J.B.Lippincott Company, Philadelphia.
- Holmes,A.R., McNab,R., Millsap,K.W., Rohde,M., Hammerschmidt,S., Mawdsley,J.L., Jenkinson,H.F.. 2001.** The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. Mol. Microbiol. 41:1395-408.
- Höltje,J.V., Tomasz,A.. 1976.** Purification of the pneumococcal N-Acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. J.Biol.Chem. 251:4199-4207.
- Horne,D., and Tomasz,A.. 1985.** Pneumococcal Forssman antigen: enrichment in mesosomal membranes and specific binding to the autolytic enzyme of *Streptococcus pneumoniae*. J.Bacteriol. 161:18-24.

Hoskins,J.,Alborn,W.E. Jr.,Arnold,J., Blaszcak,L.C., Burgett,S., DeHoff,B.S., Estrem,S.T., Fritz,L., Fu,D.J., Fuller,W., Geringer,C., Gilmour,R., Glass,J.S., Khoja,H., Kraft,A.R., Lagace,R.E., LeBlanc,D.J., Lee,L.N., Lefkowitz,E.J., Lu,J., Matsushima,P., McAhren,S.M., McHenney,M., McLeaster,K., Mundy,C.W., Nicas,T.I., Norris,F.H., O'Gara,M., Peery,R.B., Robertson,G.T., Rockey,P., Sun,P.M., Winkler,M.E., Yang,Y., Young-Bellido,M., Zhao,G., Zook,C.A., Baltz,R.H., Jaskunas,S.R., Rosteck,P.R. Jr., Skatrud,P.L., Glass,J.I. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J.Bacteriol. 183:5709-5717.

Houldsworth,S., Andrew,P.W., Mitchell,T.J.. 1994. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β by human mononuclear phagocytes. Infect.Immun. 62:1501-1503.

Hummell,D.S., Swift,A.J., Tomasz,A., Winkelstein,J.A.. 1985. Activation of the Alternative Complement Pathway by Pneumococcal Lipoteichoic Acid. Infect.Immun. 47:384-387.

Humphrey,J.H.. 1948. Hyaluronidase production by pneumococci. J.Pathol.Bacteriol. 55:273-275.

Hunter,W.M., and Greenwood,F.C.. 1962. Preparation of iodine 131 labeled human growth hormone of high specific activity. Nature 194:495-496.

Husson, M.O., Legrand,D., Spik,G., Leclerc,H.. 1993. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. Infect.Immun. 61:2694-2697,

Insel,R.A., and Anderson,P.W.. 1986. Oligosaccharide-protein conjugate vaccines induce and prime for oligoclonal IgG antibody responses to the *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide in human infants. J.Exp.Med. 163:262-269.

Istre,G.R., Tarpay,M., Anderson,M., Pryor,A., and Welch,D.. 1987. Invasive Disease Due to *Streptococcus Pneumoniae* in an Area With a High Rate of Relative Penicillin Resistance. The J.of Inf.Dis. 156:732-735.

Jacobs,M.R., Koornhof,H.J., Robins-Browne,R.M., Stevenson,C.M., Vermaak,Z.A., Freiman,I., Miller,G.B., Witcomb,M.A., Isaacson,M., Ward,J.I., Austrian,R.. 1978. Emergence of multiply resistance pneumococci. N.Engl.J.Med. 299:735-740.

Jameson,B.A., Wolf,H.. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. CABIOS 4:181-186.

Jiang,M., McLachlan,P.R., Babiuk,L.A., Potter,A.A.. 1997. A bovine lactoferrinbinding protein of *Streptococcus uberis*: identification of the protein and characterization of the gene Abstract, 97th ASM General Meeting, Florida, Miami Beach, B-503, p.115.

Johansson,B.. 1960. Isolation of an iron containing red protein from human milk. Acta Chem.Scand. 14:510-512.

Johnson,M.K.. 1977. Cellular location of pneumolysin. FEMS Microbiol.Let.2:243-245.

- Johnston, R.B. Jr.. 1991.** Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev.Infect.Dis.* 13:509-517.
- Kalfas, S., Andersson,M., Edwardsson,S., Forsgren,A., Naidu,A.S.. 1991.** Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. *Oral Microbiol Immunol* 6:350-355.
- Kayser,F.h., Bienz,K.A., Eckert,J., und Lindemann,J.. 1997.** Medizinische Mikrobiologie - Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie und Parasitologie. 9. Auflage, Thieme Verlag, Deutschland.
- Käythy,H., Ahman,H., Rönnerberg,PR., et al.. 1995.** Pneumococcal polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccine is immunogenic in infants. *J.Infect.Dis.* 172:1273-1278.
- Käythy,H., and Eskola,J.. 1996.** New vaccines for the prevention of pneumococcal infections. *Emerg.Infect.Dis.* 2:289-298.
- Kelly,R.T., Farmer,S., Greiff,D.. 1967.** Neuraminidase activity of clinical isolates of *Diplococcus pneumoniae*. *J.Bacteriol.* 94:272-273.
- Klugman,K.P.. 1990.** Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin.Microbiol.* 3:171-196.
- Kolberg,J., and Sletten,K.. 1996.** Monoclonal Antibodies That Recognize a Common Pneumococcal Protein with Similarities to Streptococcal Group A Surface Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Infect.Immun.* 64:3544-3547.
- Kamboj,K.K., King,C.L., Greenspan,N.S., Kirchner,H.L., Schreiber,J.R.. 2001.** Immunization with *Haemophilus influenzae* type b-CRM(197) conjugate vaccine elicits a mixed Th1 and Th2 CD(4+) T cell cytokine response that correlates with the isotype of antipolysaccharide antibody. *J.Infect.Dis.* 184:931-935.
- Kreig,N.R., Holt,J.G. (eds.). 1986.** Family II. *Streptococceae* fam. No. 7 *Streptococcus pneumoniae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 499-500
- Kretchmar,S.A., and Raymond,K.N.. 1986.** Biphasic kinetics and temperature dependence of iron removal from transferrin by 3,4-LICAMS. *J.Am.Chem.Soc.* 108:6212-6218.
- Kvetnaia,A.S., Kostiukova,N.N., Ivanova,V.V., Volkova,M.O., Loskutova,N.G.. 1995.** *Streptococcus pneumoniae* adhesion. *Zh.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol.* 5:23-26.
- Kyte,J., Dollittle,R.F.. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157:105-132.
- Lahteenmaki,K., Virkola,R., Pouttu,R., Kuusela,P., Kukkonen,M., Korhonen,T.K.. 1995.** Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect.Immun.* 63:3659-3664.
- Lancefield,R.C.. 1933.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J.Exp.Med.* 57:571-595.

- Lassiter, M.O., Newsome,A.L., Sams,L.D., Arnold,R.R. 1987.** Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. J.Dent.Res. 66:480-485,
- Leon,M.A., Young,N.M.. 1971.** Specificity for phosphorylcholine of six murine myeloma proteins reactive with *Pneumococcus* C polysaccharide and β -lipoprotein. Biochemistry 10:1424-1429.
- Levay,P.F. and Viljoen,M.. 1995.** Lactoferrin. A general review. Haematologica. 80:252-267.
- Lipsitch,M.. 1999.** Bacterial vaccines and serotype replacement: lessons from *Haemophilus influenzae* and prospects for *Streptococcus pneumoniae*. Emerg.Infect.Dis. 5:336-345.
- Lipsitch,M.. 2001.** Interpreting results from trials of pneumococcal conjugate vaccines: a statistical test for detecting vaccine-induced increases in carriage of nonvaccine serotypes. Am.J.Epidemiol. 154:85-92.
- Litwin,C.M., Calderwood,S.B.. 1993.** Role of iron in regulation of virulence genes. Clin.Microbiol.Rev. 6:137-149.
- Lock,R.A., Paton,J.C., Hansman,D.. 1988.** Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. Microbiol.Pathog. 5:461-467.
- Lock,R.A., Hansman,D., Paton,J.C.. 1992.** Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. Microbiol.Pathog. 12:137-143.
- Lund,E., Henrichsen,J.. 1987.** Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: Bergan,T., Norris,J.R. (eds.). Methods in Microbiology. Vol.12, New York, Academic Press, 241-261.
- Macham,L.P., Stephenson,M.C., and Ratledge,C.. 1977.** Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: the isolation, purification and function of exochelin MS. J.Gen.Microbiol. 101:41-49.
- Makey, D.G., and Seal,U.S.. 1976.** The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. Biochim.Biophys.Acta 453:250-256.
- Male,C.J.. 1979.** Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 26:254-261.
- Martin,C.,Briese,T., Hakenbeck,R.. 1992.** Nucleotide sequences of genes encoding penicillin-binding proteins from *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* with high homology to *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 1a and 1b. J.Bacteriol 174:4517-4523.
- Masson,P.L., and Heremans,J.F.. 1971.** Lactoferrin in milk from different species. Comp.Biochem.Physiol. 39B:119-129.

- Matsumoto,A. , Yoshima,H. , Takasaki,S. , and Kobata,A.. 1982.** Structural study of the sugar chains of human lactoferrin: finding fo four novel complex-type asparagine-linked sugar chains. *J.Biochem.* 91:143-155.
- McClelland,M., Hanish,J., Nelson,M., and Patel,Y.. 1988.** KGB: a single buffer for all restriction endonucleases. *Nucleic.Acids.Res.* 16:364.
- McDaniel,L.S., Scott,G., Kearney,J.F., and Briles,D.E.. 1984.** Monoclonal antibodies against protease senistive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J.Exp.Med.* 160:386-397.
- McDaniel, L.S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W.R., and Briles, D.E.. 1987.** Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J.Exp.Med.* 165:381-394.
- McDaniel, L.S. and Briles, D.E.. 1988.** A pneumococcal surface protein (PspB) that exhibits the same protease sensitivity as streptococcal R antigen. *Infect.Immun.* 56:3001-3003.
- McDaniel,L.S. ,Sheffield,J.S., Delucchi,P., and Briles,D.E.. 1991.** PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against prnuemococci of more than one capsular type. *Infect.Immun.* 59:222-228.
- McDaniel,L.S. ,Sheffield,J.S., Swiatlo,E., Yother,J., Crain,M.J., Briles,D.E.. 1992.** Molecular localization of variable and conserved regions of *pspA*, and identification of additional *pspA* homologous sequences of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb.Pathog.* 13:261-269.
- McDaniel,L.S., Ralph,B.A., McDaniel,D.O., and Briles,D.E.. 1994.** Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. *Microb.Pathog.* 17:323-337.
- McDaniel,L.S., Loechel,F., Benedict,C., Greenway,T., Briles,D.E., Conry,R.M., Curiel,D.T.. 1997.** Immunization with a plasmid expressing pneumococcal surface protein A (PspA) can elicit protection against fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Gene Ther.* 4:375-377.
- McDaniel,L.S., McDaniel,D.O., Hollingshead,S.K. and Briles,D.E.. 1997.** DNA Sequencing of the Gene Encoding a Cross-Protective Variant of PspA of *Streptococcus pneumoniae* EF5668. Unpublished. Sequence submitted direct to GenBank, accession number: U89711.
- McDaniel,L.S., McDaniel,D.O., Hollingshead,S.K., and Briles,D.E.. 1998.** Comparison of the PspA sequence from *Streptococcus pneumoniae* EF5668 to the previously identified PspA sequence from strain Rx1 and ability of PspA from EF5668 to elicit protection against penumococci of different capsular types. *Infect.Immun.* 66:4748-4754.
- McKenna,W.R., Mickelsen,P.A., Sparling,P.F., Dyer,W.. 1988.** Iron uptake from lactoferrin and transferrin by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect.Immun.* 56:785-791.

- Menozi,F.D., Gantiez,C., Locht,G.. 1991.** Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect.Immun.* 59:3982-3988.
- Metz-Boutigue,M.H., Jolles,J. , Mazurier,J. , et al.. 1984.** Human lacto-transferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur.J.Biochem.* 145:659-676.
- Mickelsen,P.A., Blackman,E., Sparling,P.F.. 1982.** Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from lactoferrin. *Infect.Immun.* 35:915-920.
- Mickelsen,P.A., Blackman,E. und Sparling,P.F..1982.** Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species to obtain iron from transferrin and iron compounds. *Infect.Immun.* 33:555-564.
- Modun,B., Wvans,R.W., Joannou,C.L., Williams,P.. 1998.** Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect.Immun.* 66:3591-3596.
- Mufson,M.A.. 1990.** *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell,G.L., Douglas,R.G., Bennet,J.E. (eds.) Principles and practice of infectious disease. New York, 1539.
- Muller-Eberhard,U., and Morgan,W.T.. 1975.** Porphyrin-binding proteins in serum. *Annals of the New York Academy of Science.* 244:624-650.
- Munoz,R., Dowson,C.G., Daniels,M., Coffey,T.J., Martin,C., Hakenbeck,R., Spratt,B.G.. 1992a.** Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol.Microbiol.* 6:2461-2465.
- Munoz,R., Musser,J.M., Crain,M., Briles,D.E., Marton,A., Parkinson,A.J., Sorensen,U., and Tomasz,A.. 1992b.** Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin.Infect.Dis.* 15:112-118.
- Murray,P.R., Drew,W.C., Kobayashi,G.S., Thompson,J.H.. 1990.** Medical Microbiology. International Student Edition. Wolfe Education Ltd. 65-84.
- Musher,D.M.. 1992.** Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin.Infect.Dis.* 14:801-809.
- Nabors,G.S., Braun,P.A., Herrmann,D.J., Heise,M.L., et al.. 2000.** Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) stimulated cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine* 18:1743-1754.
- Naidu,A.S., Andersson,M., Forsgren,A.. 1992.** Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *J.Med.Microbiol.* 36:177-183.
- Navarre,W.W., Schneewind,O.. 1999.** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol.Mol.Biol.Re.* 63:174-229.

- Nayak,A.,R., Tinge,S.A., Tart,R.C., McDaniel,L.S., Briles,D.E., and Curtiss, III,R.. 1998.** A Live recombinant avirulent oral *Salmonella* vaccine expressing pneumococcal surface protein A induces protective responses against *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 66: 3744-3751.
- Neeleman C, Geelen SP, Aerts PC, Daha MR, Mollnes TE, Roord JJ, Posthuma,G, van Dijk H, Fleer A. 1999.** Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. Infect.Immun. 67:4517-4524.
- deNeeling,A.J.. 1996.** on-line-Publikation beim European Network for Antimicrobial Resistance and Epidemiology (ENARE) (<http://www.ewi.med.uu.nl/enare/>)
- Neu,H.C.. 1992.** The crisis in antibiotic resistance. Science 257:1064-1073.
- Nicholson,A., Lepow,I.H.. 1979.** Host defense against Neisseria meningitidis requires a complement-dependent bactericidal activity. Science 205:298-299.
- Nielsen,H., Engelbrecht,J., Brunak,S., und vonHeijne,G.. 1997.** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10:1-6.
- Nikaido,H.. 1996.** in Escherischia coli and Salmonella typhimurium. Neidhardt,F.C. (ed.), ASM-Press, Washington, D.C., 29-47.
- Ogunniyi,A.D., Folland,R.L., Briles,D.E., Hollingshead,S.K., Paton,J.C.. 2000.** Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 68:3028-3033.
- Otto,B.R., Verweij-van Vught,A.M.J.J., McLaren,D.M.. 1992.** Transferrin and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. Crit.Rev.Microbiol. 18:217-233.
- Paton,J.C., Andrew,P.W., Boulnois,G.J., Mitchell,T.J.. 1993.** Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. Annu.Rev.Microbiol. 47:89-115.
- Paton,J.C., Ferrante,A.. 1983.** Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. Infect.Immun. 41:1212-1216.
- Paton,J.C.. 1996.** The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. Trends Microbiol. 4:103-106.
- Paton, J.C., Berry,A.M., Lock,R.A.. 1997.** Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins. Microbial Drug Resistance 3:1-10.
- Paton,J.C.. 1998.** Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential. Trends in Microbiol. 6:85-87.
- Payne,S.M.. 1988.** Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae.Crit.Rev.Microbiol. 16:81-111.

- Payne,S.M.. 1993.** Iron acquisition in microbial pathogenesis. Trends Microbiol. 1:66-69.
- Pearce,B.J., Naughton,A.M., Masure,H.R.. 1994.** Peptide permeases modulate transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Mol.Microbiol. 12:881-892.
- Petterson,A., von der Ley,P., Poolman, J.T., and Tommasen,J.. 1993.** Molecular characterization of the 98-kilodalton iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. Infect.Immun. 61:4724-4733.
- Petterson,A., Klarenbeek,V., van Deuzen,J., Poolman, J.T., and Tommasen,J.. 1994.** Molecular characterization of the structural gene for the lactoferrin receptor of the meningococcal strain H44/76. Microb.Pathog. 17:395-408.
- Petterson,A., Maas,A., and Tommassen,J.. 1994.** Identification of the *iroA* gene product of *Neisseria meningitidis* as a lactoferrin receptor. J.Bacteriol. 176:1764-1766.
- Petterson, A., Poolman, J.T., von der Ley,P., and Tommasen,J.. 1997.** Response of *Neisseria meningitidis* to iron limitation. Antonie van Leeuwenhoek. 71:129-136.
- Petterson, A, Prinz,T., Umar,A., van der Biezen,J., Tommassen,J.. 1998.** Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. Mol.Microbiol. 27:599-610.
- Podvin,L., Reyssset,G., Hubert,J., Sebald,M.. 1988.** Presence of choline in teichoic acids of *Clostridium acetobutylicum* N1-4. J.Gen.Microbiol. 134:1603-1609.
- Poulsen,K., Reinhold,J., Kilian,M.. 1996.** Characterization of the *S. pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) and its translation product. Infect.Immun. 64:3957-3966.
- Querineau,P., Masson,P.L., Heremans,J.F.. 1971.** Molecular weight, single chain structure and amino acid composition of human lactoferrin. Eur.J.Biochem. 20:420-425.
- Ram,S., Sharma,A.K., Simpson,S.D., Gulati,S., McQuillen,D.P., Pangburn,M.K., Rice,P.A.. 1998.** A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. J.Exp.Med. 187:743-752.
- Rapola,S., Salo,E., Kiiski,P., Leinonen,M., Takala,A.K.. 1997.** Comparison of four different sampling methods for detecting pharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children. J.Clin.Microbiol. 35:1077-1079.
- Redhead,K., Hill,T., and Chart,H.. 1987.** Interaction of Lactoferrin and Transferrins with the Outer Membrane of *Bordetella pertussis*. J.Gen.Microbiol. 133:891-898.
- Reinert,R.R., Queck,A., Kaufhold,A., Kresken,M., and Luetthicken,R.. 1994.** Antibiotic sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* isolated from normally sterile body sites. First results of a multicenter study in Germany. Infection 22:113-114.
- Ridgway,E.J.,Tremlett,C.H., Allen,K.D.. 1995.** Capsular serotypes and antibiotic sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* isolated from primary-school children. J.Infect.30:245-251.

- Riesenfeld-Orn,I., Wolpe,S., Garcia-Bustos,J.F., Hoffmann,M.K., Tuomanen,E.. 1989.** Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect.Immun.* 57:1890-1893.
- Rijkers,G.T., Breukels,M.A., Sanders,E.A.M., Zegers,B.J.M.. 1997.** Defects in antibody formation to *Streptococcus pneumoniae*. Forth European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus, Niederlande. Abstract A.5.
- Robbins,J.B., Austrian, R., Lee,C-J., et al.. 1983.** Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J.Infect.Dis.* 148:1136-1159.
- Robeson,J.P., Barletta,R.G., and Curtiss III,R.. 1983.** Expression of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 153:211-221.
- Robins-Browne,R.M., and Prpic,J.K.. 1985.** Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* 47:774-779.
- Rogers,H.J.. 1973.** *Infect.Immun.* 7:445.
- Rosenow,C.P., Ryan,P., Weiser,J.N., Johnson,S., Fontan,P., Ortqvist,A., and Masure,H.R.. 1997.** Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol.Microbiol.* 25:819-829.
- Rubins,J.B., Duane,P.G., Charboneau,D., Janoff,E.N.. 1992.** Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infect.Immun.* 60:1740-1746.
- Russell,L.M., Cryz,S.J.J., and Holmes,R.K.. 1984.** Genetic and biochemical evidence for a siderophore-dependent iron transport system in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect.Immun.* 45:143-149.
- Russell,M.W., Prince,S.J., Ligthart,G.J., Mestecky,J., Radl,J.. 1990.** Aging. *Immunol.Infect.Dis.* 2:275-286.
- Russel,R.R., Aduse-Opuku,J., Tao,L., and Ferretii,J.J.. 1992.** A bonding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J.Biol.Chem.* 267:4631-4637.
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.b, Horn,G.T., Erlich,H.A., and Arnheim,N.. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.. 1989.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y..
- Sampson,J.S., O'Connor,S.P., Stinson,A.R., Tharpe,J.A., Russel,H.. 1994.** Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *S. pneumoniae* gene encoding a 37-kDa protein homologous to previously reported *Streptococcus* spp. adhesins. *Infect.Immun.* 62:319-324.

- Sanchez-Beato,A.R., Concepcion,R., Garcia,J.L. 1995.** Tracking the Evolution of the Bacterial Cholin-Binding Domain: Molecular Characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* Gene. J.Bacteriol. 177:1098-1103.
- Sanchez-Beato,A.R., Garcia,J.L. 1997.** Direct submission to GenBank. Accession number: Z82002.
- Sanchez-Beato,A.R., Lopez,R., Garcia,J.L. 1998.** Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol.Lett. 164:207-214.
- Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R.. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467.
- Sanz,J.M., Lopez,R., and Garcia,J.L.. 1988.** Structural requirements of choline derivatives for 'conversation' of pneumococcal amidase. FEBS Lett. 232:308-312.
- Scalon,K.L., Diven,W.F., Glew,R.H.. 1989.** Purification and properties of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase. Enzyme 41:143-150.
- Scatchard,G.. 1949.** The attraction of proteins for small molecules and irons. Ann.N.Y.Acad.Sci. 51:660-672.
- Schlegel,H.G.. 1992.** Allgemeine Mikrobiologie. 7.Auflage, Georg Thieme Verlag.
- Schneewind,O., Fowler,A., and Faull,K.. 1995.** Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. Science 268:103-106.
- Schneider,R., and Hantke,K.. 1993.** Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding-dependent transport system. Mol.Microbiol. 8:111-121.
- Schryvers,A.B.. 1988.** Characterization of the human transferrin and lactoferrin receptors in *Haemophilus influenzae*. Mol.Microbiol. 2:467-472.
- Schryvers,A.B.. 1989.** Identification of the transferrin- and lactoferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. J.Med.Microbiol. 29:121-130.
- Schryvers,A.B., and Morris,L.J.. 1988.** Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. Mol.Microbiol. 2:281-288.
- Schryvers, A.B., Morris,L.L.. 1988.** Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. Infect.Immun. 56:1144-1149.
- Schryvers, A.B., and Lee,B.C.. 1989.** Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family Neisseriaceae. Can.J.Microbiol. 35:409-415.
- Schwyn,B., Neilands,J.B.. 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal.Biochem. 160:47-56.

- Shapiro,E.D., Berg,A.T., Austrian,R., Schroeder,D., Parcells,V., Margolis,A., Adair,R.K., Clemens,J.D.. 1991.** The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N.Engl.J.Med.* 325:1453-1460.
- Sheffield,J.S., Benjamin,W.H., und McDaniel,L.M.. 1992.** Detection of DNA in Southern blots by chemiluminescence is a sensitive and rapid technique. *BioTechniques* 12:836-839.
- Shelly,M.A., Jacoby,H., Riley,G.J., Graves,B.T., Pichichero,M., and Treanor,J.J.. 1997.** Comparison of pneumococcal polysaccharide and CRM₁₉₇ conjugated pneumococcal oligosaccharide vaccines in young and elderly adults. *Infect.Immun.* 65:242-247.
- Shinefield,H.R., Black,S., Ray,P. et al.. 1999.** Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 18:757-763.
- Short,J.M.,Fernandez,J.M., Sorge,J.A., Huse,W.D.. 1988.** Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16:7583-7600.
- Siber,G.R.. 1994.** Pneumococcal disease: prospects for a new generation of vaccines. *Science* 265:1385-1387.
- Simberkoff,M.S., El Sadr,W., Schiffman,G., Rahal,J.J.Jr.. 1984.** *Streptococcus pneumoniae* infections and bacteremia in patients with acquired immune deficiency syndrome, with report of a pneumococcal vaccine failure. *Am.Rev.Respir.Dis.* 130:1174-1176.
- Simonson,C., Brener,D., DeVoe,I.W.. 1982.** Expression of a high affinity mechanism for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. *Infect.Immun.* 36:107-113.
- Soerensen,M. and Soerensen, S.P.L..1939.** The protein in whey. *C.R.Trav.Lab. Carlsberg.* 23:55-99.
- Soh,S.W., Poh,C.L., Lin,R.V.. 2000.** Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from pediatric patients in Singapore. *Antimicrob.Agents Chemother.* 44:2193-6.
- Southern,E.M.. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503-517.
- Spellerberg,B., Cundell,D.R., Sandros,J., Pearce,B.J., Idanpaan-Heikkila,I., Rosenow,C., Masure,H.R.. 1996.** Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol.Microbiol.* 19:803-813.
- Solari,R., and Kraehenbuhl,J.P.. 1984.** Biosynthesis of the IgA antibody receptor: a model for the trans-epithelial sorting of a membrane glycoprotein. *Cell* 36:61-71.
- Staggs,T.M., Greer,M.K., Baseman,J.B., Holt,S.C., Tyron,V.V.. 1994.** Identification of lactoferrin-binding proteins from *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* and *Treponema denticola*. *Mol.Microbiol.* 12:613-619.

- Stein,K.E.. 1992.** Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J.Infect.Dis.* 165:49-52.
- Steinhoff,M.C., Edwards,K., Keyserling,H.. 1994.** A randomized comparison of three bivalent *Streptococcus pneumoniae* glycoprotein conjugate vaccines in young children: effect of polysaccharide size and linkage characteristics. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 13:368-372.
- Sternberg,G.M.. 1881.** A fatal form of septicaemia in the rabbit produced by the subcutaneous injection of saliva. *Nat.Board of Health Bulletin* 2:781-783.
- Swiatlo,E., Brooks-Walter,A., Briles,D.E., McDaniel,L.S.. 1997.** Oligonucleotides identify conserved and variable regions of *pspA* and *pspA*-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 188:279-284.
- Swiatlo,E., Champlin,F.R., Holman,S.C., Wilson,W.W., Watt,J.M.. 2002.** Contribution of Choline-Binding Proteins to Cell Surface Properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 70:412-415.
- Szalai,A.J., Briles,D.E., Volanakis,J.E.. 1995.** Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J.Immunol.* 155:2557-2563.
- Szalai,A.J., Briles,D.E., Volanakis,J.E.. 1996.** Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 64:4850-4853.
- Tai,S.S., Lee,C.-J., Winter,R.E.. 1993.** Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 61:5401-5405.
- Tai,S.S., Wang,T.R., Lee,C.-J.. 1997.** Characterization of hemin-binding activity of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 65:1083-1087.
- Takala,A.K., Eskola,J., Leinonen,M., Käythy,H., Nissinen,A., and Pekkanen,E.. 1991.** Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J.Infect.Dis.* 164:982-986.
- Talkington,D.F., Crimmins,D.L., Voellinger,D.C., Yother,J., and Briles,D.E.. 1991.** A 43-kilodalton pneumococcal surface protein PspA: isolation, protective abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence. *Infect.Immun.* 59:1285-1289.
- Talkington,D.F., Voellinger,D.C., McDaniel,L.S., and Briles,D.E.. 1992.** Analysis of pneumococcal PspA microheterogeneity in SDS polyacrylamide gels and the association of PspA with the cell membrane. *Microb.Pathog.* 13:343-355.
- Talkington,D.F., Brown,B.G., Tharpe,J.A., Koenig,A., Russell,H.. 1996.** Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). *Microb.Pathog.* 21:17-22.
- Tart,R.C., McDaniel,L.S., Ralph,B.A., Briles,D.E.. 1996.** Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J.Infect.Dis.* 173:380-386.

Taylor,R.G., Walker,D.C., McInnes,R.R.. 1993. *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. Nucl.Acids Res. 21:1677-1678.

Tettelin,H., Nelson,K.E., Paulsen,I.T., Eisen,J.A., Read,T.D., Peterson,S., Heidelberg,J., DeBoy,R.T., Haft,D.H., Dodson,R.J., Durkin,A.S., Gwinn,M., Kolonay,J.F., Nelson,W.C., Peterson,J.D., Umayam,L.A., White,O., Salzberg,S.L., Lewis,M.R., Radune,D., Holtzapple,E., Khouri,H., Wolf,A.M., Utterback,T.R., Hansen,C.L., McDonald,L.A., Feldblyum,T.V., Angiuoli,S., Dickinson,T., Hickey,E.K., Holt,I.E., Loftus,B.J., Yang,F., Smith,H.O., Venter,J.C., Dougherty,B.A., Morrison,D.A., Hollingshead,S.K., Fraser,C.M.. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Science 293:498-506.

Tigyi,Z., Kishore,A.R., Meland,J.A., Forgren,A., Naidu,A.S.. 1992. Lactoferrin-binding proteins in *Shigella flexneri*. Infect.Immun. 60:2619-2626.

Toma, C. 1996. Effect of *Vibrio cholerae* non-O1 protease on lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A. FEMS Microbiol.Letters 135:143-147.

Tomasi,T.B.. 1989. Regulation of the mucosal IgA response - an overview. Immunol.Invest. 18:1-15.

Tomasz,A.. 1981. Surface Components of *Streptococcus pneumoniae*. Rev.Infect.Dis. 3:190-211.

Tomasz,A.. 1991. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Abstract no 313. In: Program and abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. p57.

Towbin,H., Staehlin,T., and Gordon,J.. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels on nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:4350.

Trivier,D., und Courcol,R.J.. 1996. Iron depletion and virulence in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol.Letters 141:117-127.

Tryon, V.V., Baseman,J.B.. 1987. The acquisition of human lactoferrin by *Mycoplasma pneumoniae*. Microb.Pathog. 3:437-443.

Tu,A.-H.T, Fulgham,R.L., McCrory,M.A., Briles,D.A., and Szalai,A.J.. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. Infect.Immun. 67:4720-4724.

Tuomanen,E.I., Tomasz,A., Hengstler,b., Zak,O.. 1985. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. J.Infect.Dis. 151:535-540.

- Tuomanen,E.I.. 1993.** Breaching the blood-brain barrier. *Sci.Am.* 268:80-84.
- Tuomanen,E.I., Austrian,M.D., Masure,H.R.. 1995.** Pathogenesis of Pneumococcal infection. *N.Engl.J.Med.* 332:1280-1284.
- Ueda,S., Shiroza,T., Kuramitsu,H.K.. 1988.** Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene* 69:101-109.
- Vadheim,C.M., Greenberg,D.P., Partridge,S., Jing,J., Ward,J.I., Kaiser-UCLA Study Group. 1993.** Effectiveness and safety of an *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (PRP-T) in young infants. *Pediatrics.* 92:272-279.
- Van Dam,J.E.G., Fleer,A., Snippe,H.. 1990.** Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie van Leeuwenhock* 58:1-47.
- Vella,P., Marburg,S., Staub,J., Kniskern,P., Miller,W., Hagopian,A., Tolman,R., Rusk,C., Chupak,L.S., and Ellis,R.. 1992.** Immunogenicity of conjugate vaccines of pneumococcal capsular polysaccharide types 6B, 14, 19F, and 23F with a meningococcal outer membrane protein complex. *Infect.Immun.* 60:4977-4983.
- Vickerman,M.M., Sulavik,M.C., Minick,P.E., Clewell,D.B.. 1996.** Changes in the Carboxyl.Terminal Repeat Region Affect Extracellular Activity and Glucan Products of *Streptococcus gordonii* Glucosyltransferase. *Infect.Immun.* 64:5117-5128.
- Vogel,L., Geluk,F., Jansen,H., Dankert,J., vanAlphen,L.. 1997.** Human lactoferrin receptor activity in non-encapsulated *Haemophilus influenzae*. *FEMS-Microbiol.Lett.* 156:165-170.
- Waltman, W.D.,II, Gray,B.M., Svanborg,D., Facklam,R., and Briles,D.E.. 1991.** Epidemiologic studies of group 9 pneumococci in terms of protein type and 9N versus 9V capsular type. *J.Infect.Dis.* 163:812-818.
- Wani,J., Gilbert,J., Plaut,A., Weiser,J.. 1996.** Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 64:3967-3974.
- Waltman,W.D. II, McDaniel,L.S., Gray,B.M., Briles,D.E.. 1990.** Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb.Pathog.* 8:61-69.
- Watson,D.A., Musher,D.M.. 1990.** Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect.Immun.* 58:3135-3138.
- Weinberg, E.D.. 1978.** Iron and infection. *Microbiol. Rev.* 42:45-66.
- Weinberg, E.D.. 1984.** Iron withholding: a defence against infection and neoplasia. *Physiol.Rev.* 64:65-102.
- Weinberg,E.D.. 1993.** The iron-withholding defense system. *ASM-News* 59:559-562.

Wessels,M.R., Rubens,C.E., Benedi,V.J., Kasper,D.L.. 1989. Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 86:8983-8987.

West,S.E.H., and Sparling,P.F.. 1985. Response of *Neisseria gonorrhoeae* to iron limitation: alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production. Infect.Immun. 47:388-394.

Whatmore,A.M., Pickerill,A.P., Dowson,C.G.. 1997. Molecular analysis of the *lytA* and *Ply* genes of *S.pneumoniae* and related oral streptococci. Fourth European Meeting A.8.

Winkelstein,J.A., Tomasz,A.. 1977. Activation of alternativ pathway by pneumococcal cell walls. J.Immunol. 118:151-154.

Winkelstein,J.A., Tomasz,A.. 1978. Activation of alternativ complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. J.Immunol. 120:174-178.

Wizemann,T.M., Heinrichs,J.H., Adamou,J.E., Erwin,A.L., Kunsch,C., Choi,G.H., Barash,S.C., Rosen,C.A., Masure,H.R., Tuomanen,E., Gayle,A., Brewah,Y.A., Walsh,W., Barren,P., Lathigra,R., Hanson,M., Langermann,S., Johnson,S., Koenig,S.. 2001. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infect.Immun. 69:1593-1598.

World Health Organization. 1996. The World Health Report 1996 - Fighting disease - Fostering development. Geneva.

Wren,B.W.. 1991. A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. Mol.Microbiol. 5:797-803.

Wu,H.-Y., Russell,M.W.. 1993. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. Infect.Immun. 61:314-322.

Wu,H.-Y., Nahm,M.H., Guo,Y., Russell,M.W., Briles,E.. 1997. Intranasal Immunization of Mice with PspA (Pneumococcal Surface Protein A) Can Prevent Intranasal Carriage, Pulmonary Infection, and Sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. J.Infect.Dis. 175:839-846.

Yamamoto,M., McDaniel,L.S., Kawabata,K., Briles,D.E., Jackson,R.J., McGhee,J.R., Kiyono,H.. 1997. Oral immunization with PspA elicits protective humoral immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infect.Immun. 65:640-644.

Yeha,S.M. und Meares,C.F.. 1980. Characterization of transferrin-metal-binding sites by diffusion-enhanced energy transfer. Biochemistry. 19:5057-5062.

Yother,J., McDaniel,L.S., Briles,D.E.. 1986. Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*. J.Bacteriol. 168:1463-1465.

Yother,J. and Briles,D.E.. 1992a. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. J.Bacteriol. 174:601-609.

- Yother,J., Handsome,G.L., Briles,D.E.. 1992b.** Truncated forms of PspA that are secreted from *Streptococcus pneumoniae* and their functional studies and cloning of the PspA gene. J.Bacteriol. 174:610-618.
- Yother, J. and White, J.M.. 1994.** Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. J.Bacteriol. 176:2976-2985,
- Yu,R.H., and Schryvers,A.B.. 1993.** Regions located in both the N-lobe and C-lobe of human lactoferrin participate in the binding interactions with bacterial lactoferrin receptors. Microb.Pathog. 14:343-353.
- Zhang,J.R., Mostov,K.E., Lamm,M.E., Nanno,M., Shimida,S., Ohwaki,M., Tuomanen,E.. 2000.** The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. Cell 102:827-837.
- Zielen,S., Ewald,F. und Bühring,I.. 1997.** Neue und alte Indikationen der Pneumokokkenimpfung. Hygiene und Mikrobiologie 1: 31-33.

7 Anhang

A Abkürzungsverzeichnis

`	Minute(n)
``	Sekunde(n)
3'-Ende	Bezeichnung des einen Endes von DNA, RNA oder Oligos, die Zahl 3 bezieht sich auf das 3. Kohlenstoffatom des Zuckerringes
5'-Ende	Bezeichnung des einen Endes von DNA, RNA oder Oligos, die Zahl 3 bezieht sich auf das 5. Kohlenstoffatom des Zuckerringes

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten:

10^3	Kilo	k
10^{-3}	Milli	m
10^{-6}	Mikro	μ
10^{-9}	Nano	n
10^{-12}	Piko	p

à	Anti (zur Bezeichnung von Antiseren)
AK	Antikörper
1° AK	primärer Antikörper
2° AK	sekundärer Antikörper
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat

β-ME	beta-Mercapto-Ethanol
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise

c	Stoffmengenkonzentration in mol/l
Ci	Curie (Strahleneinheit, $1\text{Ci}=3,7\cdot 10^{10}$ Becquerel)
2,4-CN	2-Chloro-4-Naphthol
CO ₂	Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
cpm	counts per minute (Zähler pro Minute)

Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destiliertes Wasser

DIG	Digoxygenin
DIG-dUTP	Digoxygenin-markiertes 11-Desoxyuracilphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Mischung der Desoxynekleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDDHA	Ethylendiamindihydroxy-Essigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälber-Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
Glc	Glucose
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
His-tag	6 Histidin-Aminosäuren
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgA-POD*	Immunglobulin A mit Peroxidase markiert
IgG	Immunglobulin G
IgG-POD*	Immunglobulin G mit Peroxidase markiert
IgG2	Immunglobulin G2
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IS	Insertionselement
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
L	Liter
LD ₅₀	Lethale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
LTA	Lipoteichonsäure
λ	Lambda
M	Molar in mol/l
mA	Milli-Ampere
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
mM	Millimolar

MG	Molekulargewicht in g/mol
min	Minute(n)
mg	Milli-Gramm
mL	Milli-Liter
mol	Einheit der Stoffmenge
μ F	Mikro-farad
μ m	Mikro-Meter
μ M	Mikro-molar
n	Stoffmenge (mol)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure (nitrilo-tri-acetic acid)
nm	Nano-Meter
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm Wellenlänge
ORF	offenes Leseraster
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phospat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	Plaque-forming unit
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Piko-Mol
POD	Peroxidase
Primer	Oligodesoxynukleotid
PVDF	Poly-Vinyliden-Di-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet ^r	Tetrazyklin-Resistenz
THB	Todd Hewitt Broth
THY	Todd Hewitt Broth mit Yeast (Hefe) supplementiert
TIGR	The Institute of Genomic Research
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ü/n	Übernacht-Inkubation

ÜNK	Übernachtkultur
ÜS	Überstand
V	Volt
VK	Vorkultur
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenkonzentration
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

B Chemikalienliste

Aceton z.A. (~ 99,5%)	Merck
Acrylamid-N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Bio-Rad
Adenin	Sigma
Agar agar	Difco
Agarose	GibcoBRL
APS	Sigma
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
CaCl ₂ -Dihydrat z.A. (~99,5%)	Merck
Chloroform	Baker
Coomassie Brilliant Blue® R250	Bio-Rad
CSPD	Boehringer
D-+-Glucose	Sigma
DMF	Merck
DNA-Größenstandards:	
$\lambda_{HindIII}$	New England Biolabs
1 kb-ladder	Gibco
100 bp-plus	MBI
DIG-Marker	Boehringer

DNase	Boehringer
DTT	Sigma
EDDHA	Sigma
EDTA	Riedel-de-Haen
Eisen-III-Chlorid	Baker
Eisen-Sulfat	Merck
Eisessig	Baker
Ethanol z.A. (~99,8%)	Merck
Ethanol (vergällt)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (Fetal Calf Serum)für ZK	Gibco
Ficoll 400	Sigma
Fluoresceinisothiocyanat	Sigma
Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glycerin z.A. (~ 87%)	Merck
Glycin	Merck
Harnstoff	Riedel-de-Haen
Hämin	Sigma
HCl	Baker
Hering Sperm DNA	GibcoBRL
IPTG	Sigma
¹²⁵ Iod	Amersham
Isopropanol	Baker
Kanamycin	Serva
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Sigma
K ₂ HPO ₄	Sigma
Kollagen, Typ IV, VI, IX	Sigma
LiCl	Sigma
Lysozym	Sigma
Magermilch (0,3% Fettanteil)	Haushaltsware
Maleinsäure	Sigma
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
Mineralöl	USB
2- Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Baker
Mutanolysin	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcitrat	Merck
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Baker
NaOH	Sigma
NH ₄ -Acetat	Riedel-de Haen
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
N-Laurylsarcosin	Sigma
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer

NZ-Amine (Casein Hydrolysat)	Otto Aldaf
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform (jeweils 50%)	Roth
pH-Meter Kalibrier-Lösungen (pH 4,0; 7,0;10,0)	Sigma
³² -Phospor	Amersham
PMSF	Sigma
Polyethylenglykol (8000)	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Protein-Größenstandards:	
SDS-7B	Sigma
Kaleidoskop Polypeptid-Standard	Bio-Rad
RNase (DNase frei)	Boehringer
Salzsäure (siehe HCl)	Baker
SDS	Fluka
TCA	Merck
TEMED	Bio-Rad
TRIZMA-Base	Sigma
Tween-20	Merck
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	ICN

C Firmennachweis

Amersham:	Life Science, Braunschweig, Deutschland
bioMérieux:	l'Etoile, Frankreich
BioRad:	München, Deutschland
Dakopatts:	Stockholm, Schweden
Dianove:	Hamburg, Deutschland
Difco Laboratories:	Detroit, USA
Eurogentech:	Seraing, Belgien
Gibco BRL:	Effenstein, Deutschland; England (Primerbestellung)
Greiner:	Nürtingen, Deutschland
J.T.Baker:	Deventer, Niederlande
Pharmacie:	Freiburg, Deutschland
QIAGEN:	Hilden, Deutschland
Packard:	Canberra, Australien
Pharmacia:	siehe Amersham
Promega:	Mannheim, Deutschland
Riedel-de Haën:	Seelze, Deutschland
Roth:	Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt:	Hildesheim, Deutschland
Schleicher und Schuell:	Dassel, Deutschland
Serva:	Heidelberg, Deutschland
Sigma:	München, Deutschland
Stratagene:	Heidelberg, Deutschland

D Herstellernachweis der Laborgeräte

Agarosegel-Elektrophoresekammer (Horizon [®] 58 ,H5 und 11.14)	GibcoBRL
Autoklav (Tecnoklav 50)	Tecnomara
Brutschrank (37°C; 28°C)	Heraeus
CO ₂ -Inkubator (5% CO ₂), Typ B5042	Heraeus
Econo-Column Pump	Bio-Rad
mit Photometer 2238 Unicord SII	LKB Pharmacia
mit Schreiber 2210 Recorder 2-Channel	LKB Pharmacia
Eismaschine	Ziegra
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand)	Bio-Rad
Feinwaage Sartorius MC1 Research RC2505	Sartorius
French [®] Pressure Cell	SLM Instruments, Inc.
Gamma(γ)-Counter (Cobra TM II Auto-GAMMA)	Packard
Gel Air Drying System	Bio-Rad
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf
Hybridisierungssofen (OV1)	Biometra
Inkubationsschüttler	HAT
Kühlschränke	Liebherr
Magnetrührer heizbar, RCT basic	KIKA-Labortechnik
Magnetrührer M20/1	Franco [®]
Mikrowelle	Brother
PCR-Thermocycler	Hybaid
pH-Meter CG 804	Schott
Photometer (4054 UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec Plus)	Pharmacia
Pipetteboy	Bio-Rad
Power Supply 200/2.0 und Power Pac 300	Bio-Rad
Quarzglasküvetten (1ml)	Helma
SDS-Gelkammer	Bio-Rad
Semi-Dry-Trans-Blot [®] SD (Transfer Cell)	Bio-Rad
Steril-Werkbank Lamin Air [®] HLB 2427	Heraus
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80°C)	Herth
Ultra-Zentrifuge Sorvall	DuPont
Ultraschallgerät Labsonic U	B.Braun
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Video-Dokumentation (Midi-Doku TM)	Herolab
Vortex Genie 2	Hobein AG
Waage 2200S	Sartorius
Wasserheizbad	GFL [®]
Zeitmesser	Junghans
Zentrifugen	
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPont
Ominifuge 2.0RS	Heraus
Biofuge 13	Heraus
Zentrifuge 5415 C und 5417 R	Eppendorf

E Stämme von *E.coli*, *GBS*, *Staphylococcus spp.* und *Streptococcus pneumoniae*

<i>Escherichia coli</i>	Genotyp	Herkunft
<i>E.coli</i> HB 101	<i>supE44</i> , <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , $\Delta(\text{gpt-proA})62$, <i>rpsL20</i> (Str ^r), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA-13</i> , $\Delta(\text{mcrA-mrr})$, HsdS ⁻ (r ⁻ m ⁻)	Promega
<i>E.coli</i> JM 109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , $\Delta(\text{lac-proAB})$ [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15]	Promega
<i>E.coli</i> M15 pREP4	<i>E.coli</i> mit Repressor-Plasmid pREP4, das den <i>lac</i> -Repressor konstitutiv auf hohem Niveau expremiert; pREP4 weist eine kan ^r auf	Qiagen
<i>E.coli</i> XL1-blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, <i>endA1</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, Tn10(tet ^r)] <i>supE44</i>	Stratagene
<i>E.coli</i> XL0LR	$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, <i>endA1</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, Tn10(tet ^r)] λ^+ , Su ⁻	Stratagene

<i>Staphylococcus spp.</i>	Bezeichnung	Herkunft
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3269	DSM
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20044	DSM
<i>Staphylococcus warneri</i>	20036	DSM
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	20038	DSM
<i>Staphylococcus cohnii</i>	20260	DSM
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	20263	DSM

<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bezeichnung	Herkunft
B12	6313 III	Medizinische Hochschule Gießen
B166	76-043	Minneapolis (Prof.Ferrieri)
B169	0153	Minneapolis (Prof.Ferrieri)
B174	0186	Minneapolis (Prof.Ferrieri)

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Serotyp - dänisch (amerikanisch)	Herkunft	Isolat-Quelle
Sp34	1 (1)	NCTC 7465	
Sp35	2 (2)	NCTC 7466 (D39)	
Sp36	3 (3)	NCTC 7978 (A66)	
Sp37	35A (47)	NCTC 10319 (R36)	
Sp50	9V (68)	ATCC 10368	
Sp51	2 (2)	ATCC 11733	
Sp52	1 (1)	ATCC 12213	
Sp53	1	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp54	3	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	

Sp55	4	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp56	6A	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp57	6B	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp58	8	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp59	7F	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp60	9V	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp61	12F	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp62	18C	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp63	19F	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp64	23F	Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK	
Sp65	9A	Düsseldorf	Blut
Sp66	11A	Düsseldorf	Blut
Sp67	1	Düsseldorf	Blut
Sp68	4	Düsseldorf	Blut
Sp69	10A	Düsseldorf	Trachea
Sp70	12F	Düsseldorf	Blut
Sp71	14	Düsseldorf	Blut
Sp72	14	Düsseldorf	Blut
Sp73	1	Düsseldorf	Liquor
Sp74	18B	Düsseldorf	Blut
Sp75	6B	Düsseldorf	Liquor
Sp76	6A	Düsseldorf	Blut
Sp77	ND	Düsseldorf	Meningitis
Sp78	1	Düsseldorf	Blut
Sp79	14	Düsseldorf	Blut
Sp80	14	Düsseldorf	
Sp81	33F	Düsseldorf	
Sp82	18F	Düsseldorf	
Sp83	6A	Düsseldorf	
Sp84	14	Düsseldorf	
Sp85	3	Düsseldorf	
Sp86	8	Düsseldorf	
Sp87	1	Düsseldorf	
Sp88	7F	Düsseldorf	
Sp89	3	Düsseldorf	
Sp90	1	Düsseldorf	
Sp91	19F	Düsseldorf	
Sp92	18B	Düsseldorf	
Sp93	6B	Düsseldorf	
Sp94	24F	Düsseldorf	
Sp95	3	Düsseldorf	
Sp96	6B	Düsseldorf	
Sp97	4	Düsseldorf	
Sp98	14	Düsseldorf	
Sp99	7F	Düsseldorf	
Sp100	23A	Düsseldorf	
Sp101	1	Düsseldorf	Blut
Sp102	23A	Düsseldorf	Liquor

Sp104	14	Düsseldorf	Liquor
Sp105	4	Düsseldorf	Blut
Sp107	18F	Düsseldorf	Blut
Sp108	19F	Düsseldorf	Liquor
Sp109	7F	Düsseldorf	Blut
Sp110	1	Düsseldorf	Blut
Sp111	9V	Düsseldorf	Blut
Sp112	23F	Düsseldorf	Blut
Sp113	unbekapselt	Jeffrey Weis (R6-IgA-Protease ⁻)	
Sp114	unbekapselt	Jeffrey Weis (P262; D39)	
Sp115	2	Regina Hakenbeck (D39)	
Sp116	unbekapselt	Regina Hakenbeck (R6)	
Sp117	k.A.	Düsseldorf	Nasopharynx
Sp118	k.A.	Düsseldorf	
Sp121	9V	Jeffrey Weis (P62)	Klinik
Sp122	9V	Jeffrey Weis (P63)	Klinik
Sp123	9V	Jeffrey Weis (P64)	Klinik
Sp124	6A	Jeffrey Weis (P376)	Klinik
Sp125	6A	Jeffrey Weis (P377)	Klinik
Sp126	6A	Jeffrey Weis (P384)	Klinik
Sp127	6B	Jeffrey Weis (P763)	Klinik
Sp128	6B	Jeffrey Weis (P765)	Klinik
Sp129	k.A.	Düsseldorf (VE3017)	Trachea
Sp130	k.A.	Düsseldorf (VE3062)	Sputum
Sp131	k.A.	Düsseldorf (VU3347)	Rachen
Sp132	k.A.	Düsseldorf (VU3416)	Mastoid
Sp133	k.A.	Düsseldorf (VU3875)	Rachen
Sp134	k.A.	Düsseldorf (VU3894)	Rachen
Sp135	k.A.	Düsseldorf (VU3881)	Nase
Sp136	k.A.	Düsseldorf (VE3680)	Nase
Sp137	k.A.	Düsseldorf (VE3220)	Auge
Sp138	k.A.	Düsseldorf (VE3485)	Auge
Sp139	unbekapselt	Tuomanen, Zysk (R6x)	
pJDC9:: <i>pspA</i> ⁻¹	unbekapselt	R6-pJDC9:: <i>pspA</i> ⁻¹	
pJDC9:: <i>pspA</i> ⁻²	unbekapselt	R6-pJDC9:: <i>pspA</i> ⁻²	

Für alle *Streptococcus pneumoniae*-Stämme ist die laufende Stammmnummer der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung sowie eine Typenbezeichnung (wenn vorhanden) angegeben. Die definierten Stämme wurden käuflich erworben von den Stammsammlungen 'National Collection of Type Cultures' (NCTC) und 'American Type Culture Collection' (ATCC). Die IgA-Protease-Mutante (Sp114) wurde von J. Weiser, University of Pennsylvania, Philadelphia, D39 (Avery et al., 1944) und R6 (Tiraby et al., 1975) von R. Hakenbeck, Universität Kaiserslautern, R6x (Tiragy und Fox, 1973) von E.I. Tuomanen, Rockefeller University, New York und G. Zysk, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Die klinischen Isolate stammen aus der Abteilung Medizinische

Mikrobiologie der Universität Düsseldorf, die uns von G. Zysk zur Verfügung gestellt wurden oder vom Statens Serum Institut in Kopenhagen, Dänemark. Sofern eine Serotypisierung erfolgte, ist der entsprechende Kapsel-Serotyp angegeben, ansonsten konnte keine Angabe (k.A.) erfolgen.

F Verbrauchsmaterialien

Cellophan	Bio-Rad
Dialyseschlauch (16mm, MWCO 12.000-14.000)	Servapor
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt
Hyperfilm™ ECL™ (high performance chemiluminescence film)	Amersham
Injektionskanüle 0,9 x 40mm	Enosa
Kurzpipette, 5ml und 10 ml (steril, Plastik)	Sterilin
Latex-Handschuhe	Meditrade
Mikrotiterplatten, Maxisorp F96	Nunc
Nitrocellulose-Disks	Bio-Rad
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad
Nylonmembran	Millipore
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner
PD10-Säulen	Pharmacia
Petrischalen für Bakterienkultur, 10mm	Greiner
Platikküvetten ,1ml	Greiner
PVDF-Membran (Immobilon™)	Millipore
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2ml	Eppendorf
Röntgenfilme	Amersham
Skalpellklingen, spitz	Bayha
Steril-Filter (0,2µM)	Sartorius
Whatman-Filterpapier	Bio-Rad
Zentrifugenröhrchen, 12 ml	Greiner

G Längenstandards für DNA und Proteine

DNA:

G1: λ HindIII Marker von New England Biolabs

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp.

G2: 1 kb-ladder von GibcoBRL

12216 bp, 11198 bp, 10180 bp, 9162 bp, 8144 bp, 7126 bp, 6108 bp, 5090 bp, 4072 bp, 3054 bp, 2036 bp, 1636 bp, 1018 bp, 507 bp, 396 bp, 344 bp, 298 bp, 220 bp, 201 bp, 154 bp, 134 bp, 75 bp.

G3: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus von MBI Fermentas

3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp.

G4: Smart Ladder von EUROGENTECH

10000 bp (100 ng), 8000 bp (80 ng), 6000 (60 ng), 5000 (50 ng), 4000 (40 ng), 3000 (30 ng), 2500 (25 ng), 2000 (20 ng), 1500 (15 ng), 1000 (10 ng), 800 (80 ng), 600 (60 ng), 400 (40 ng), 200 (20 ng).

G5: DIG- λ _{HindIII}-Marker von Boehringer

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp.

Proteine:**G6: SDS-7B von Sigma, vorgefärbt**

180000 Da, 108000 Da, 84000 Da, 67000 Da, 55000 Da, 39500 Da, 35000 Da.

G7: Kaleidoskop Polypeptid-Standard von Bio-Rad

38600 Da, 25000 Da, 16300 Da, 7800 Da, 3400 Da.

H Vektor-Ansicht**pJDC9**

T₁T₂; t₀: Terminatoren

MCS: Multiple Cloning Site

Er: Erythromycin-Resistenz

I Adressen von web-Seiten

Link-Sammlung mit direktem Zugriff auf alle großen Gendatenbanken:

<http://www.genetics.com/genetics/genetics/research/discresearch/resources/>

Das National Center for Biotechnology Informatics (NCBI) in den U.S.A.:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Das European Molecular Biology Laboratory (EMBL):

<http://www.embl-heidelberg.de>

Die Sequenzierung des Genoms von *S. pneumoniae* erfolgte von 'The Institute for Genomic Research' (TIGR):

<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=bsp>

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Petra Heidi Prieß, geb. Remane
Geburtsdatum: 04.11.1968
Geburtsort: Hannover
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schul Ausbildung:

1975 - 1988 Grundschole, Orientierungsstufe und Gymnasium mit Abitur in Braunschweig

Berufsausbildung:

1988 - 1990 Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Berufsfachschule Dr. von Morgenstern in Braunschweig

Hochschulstudium:

1990 - 1996 Biologie an der Technischen Universität Braunschweig, Studienschwerpunkte: Biochemie, Mikrobiologie, Genetik
Diplomarbeit im Bereich 'Mikrobielle Pathogenität' an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, und bei der 'Commonwealth Science of Industrial Research Organisation - CSIRO' in Sydney, Australien, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G.S. Chhatwal mit dem Thema:
'Die IgA-Bindungsdomäne des C-Proteins von Gruppe B Streptokokken: Lebend-Impfstoff- und DNA-Immunisierung im Vergleich'
1996 Abschluß: Diplom-Biologin

Promotion:

ab 1996 Promotionsarbeit an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, unter der Leitung von Prof. Dr. G.S. Chhatwal mit dem Thema:

'Molekulare Charakterisierung und pathogene Bedeutung von cholinbindenden Proteinen von *Streptococcus pneumoniae*'
Tag des Rigorosum: 24.05.2002 (Dr.rer.nat.)

Stipendien:

1998 EMBO/FEBS/UNESCO-Stipendium zur Teilnahme an der 'International Summer School on Molecular and Cell Biology - Molecular Basis of Bacterial Infection' in Spetsai, Griechenland
1998 VAAM/DGHM-Stipendium zur Teilnahme an der 'Spätsommerschule - Mikrobielle Pathogenität' in Zinnowitz

Studiumbegleitende Arbeit:

1992 - 1994 Studentische Aushilfskraft an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig
1994, 1998 Assistentin im Mikrobiologie- und Biotechnologie-Praktikum am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität in Braunschweig

Weiterbildung:

1996 Fortbildungsveranstaltung nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr.3 GenTSV

Beruf:

ab Okt. 1999 Pharmareferentin bei der Hoffmann-La Roche AG, Bereich Onkologie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe 'Mikrobielle Pathogenität' im Bereich Mikrobiologie der GBF in Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K.N. Timmis danke ich, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, mich mit dem interessanten Thema der mikrobiellen Pathogenität und Impfstoffforschung auseinanderzusetzen und die Doktorarbeit anzufertigen. Ferner danke ich ihm für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. G.S. Chhatwal danke ich für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, sowie die Übernahme des Koreferates. Darüber hinaus möchte ich mich sehr für sein Engagement bei meinen FEBS- und DGHM-Stipendienanträgen für die 'Sommerschulen' bedanken.

Herrn Dr. S. Hammerschmidt gilt mein besonderer Dank für den Hauptteil der Betreuungsarbeit, für die vielen wertvollen Anregungen für meine Arbeit und für die schnelle und kritische Durchsicht des Manuskriptes; zumal sich die Erstellung dieses Manuskriptes über Schwangerschaft und Geburt meiner Zwillinge hinauszog.

Danken möchte ich auch Frau Dr. S.R. Talay, Frau Dr. G. Molinari und Herrn Dr. M. Rohde, die in unseren 'Lab-meetings' stets interessante Diskussionspunkte in meiner Arbeit aufzeigten.

Dr. Gregor Zysk, Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Bereitstellung der klinischen Isolate und dem Vektorkonstrukt zur Transformation.

Dankeschön an Frau A. Krüger und Herrn C. Strömpl für die vielen DNA-Sequenzierungen.

Ebenfalls Danke ich Herrn Dr. M. Kieß und Frau R. Getzlaff für die Protein-Sequenzierungen.

Frau C. Elm danke ich für die technische Assistenz, die sie während ihrer 'Hiwi-Zeit' bei mir leistete.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau S. Bermann und Frau S. Wolff bedanken, die mir mit Glücksschweinen und 4-blättrigen Kleeblättern über manchen Frust hinweghalfen.

Weiterhin möchte ich der 'guten Seele' im Labor, Frau M. Tillig danken. Aufgrund ihrer gewissenhaften Labororganisation und steten Hilfsbereitschaft haben viele Versuche schneller funktioniert. Auch Frau K. Mummenbrauer danke ich für ein offenes Ohr für alle Probleme und ihre helfenden Hände.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. G. Bethe für ihre Freundschaft und die sehr schöne Zeit im Labor danken, in der wir noch gemeinsam über so manches Proteingel oder manchen Wachstumsversuch 'hingen'.

Meinem Schwager Herrn F. Kessler möchte ich sehr für sein Engagement beim Druck dieser Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die viel Verständnis für meine Arbeit zeigten und mich stets unterstützten. Gerade in der 'Schreibphase' betreuten sie Jana und Alexander viele Wochen und hielten mir so den Weg zum Schreibtisch frei.

Und ebenfalls ganz besonders möchte ich meinem Mann Jan danken, daß wir diese schwere Zeit der vielen Ereignisse so glänzend gemeistert haben.